

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

OSCAR ALEXANDER AGUIRRE-OBANDO

Variabilidade genética do canal de sódio voltagem-dependente em populações naturais de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* da Colômbia e do Brasil: Importantes mosquitos vetores de arbovírus.

The voltage-gated sodium channel genetic variability on *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* natural populations from Colombia and Brazil: Important mosquitoes borne diseases.

CURITIBA

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

OSCAR ALEXANDER AGUIRRE-OBANDO

Variabilidade genética do canal de sódio voltagem-dependente em populações naturais de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* da Colômbia e do Brasil: Importantes mosquitos vetores de arbovírus.

The voltage-gated sodium channel genetic variability on *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* natural populations from Colombia and Brazil: Important mosquitoes borne diseases.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de concentração em Entomologia, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Entomologia).

Orientador: Prof. Dr. Mário Antônio Navarro da Silva (UFPR/LEMV).

Co-orientador: Dr. Ademir de Jesus Martins Junior (IOC/LAFICAVE).

CURITIBA

2016

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Aguirre-Obando, Oscar Alexander

Variabilidade genética do canal de sódio voltagem-dependente em populações naturais de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* da Colômbia e do Brasil: importantes mosquitos vetores de arbovírus. / Oscar Alexander Aguirre-Obando. – Curitiba, 2016.

98 f. ; 30cm.

Orientador: Prof. Dr. Mário Antônio Navarro da Silva

Co-orientador: Dr. Ademir de Jesus Martins Junior

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação Ciências Biológicas (Entomologia).

1. *Aedes aegypti* 2. *Aedes albopictus*. 3. Resistência a inseticidas. 4. Entomologia - Pesquisa I. Título II. Silva, Mário Antônio Navarro da III. Martins Junior, Ademir de Jesus IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Entomologia).

CDD (22 ed.) 614.4323

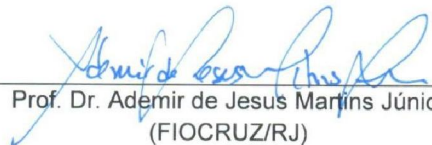
OSCAR ALEXANDER AGUIRRE OBANDO

"Variabilidade genética do canal de sódio voltagem-dependente em populações naturais de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* da Colômbia e do Brasil: importantes mosquitos vetores de arbovírus"

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de "Doutor em Ciências", no Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração em Entomologia, da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:



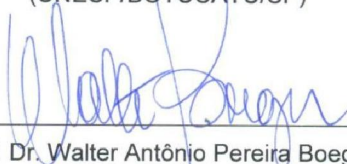
Prof. Dr. Mário Antônio Navarro da Silva (Orientador)
(UFPR)



Prof. Dr. Ademir de Jesus Martins Júnior
(FIOCRUZ/RJ)



Prof. Dr. Paulo Eduardo Martins Ribolla
(UNESP/BOTUCATU/SP)



Prof. Dr. Walter Antônio Pereira Boeger
(UFPR)



Prof. Dr. Márcio Roberto Pie
(UFPR)

Curitiba, 17 de novembro de 2016.

Dedico este trabalho a minha esposa por todo o apoio e carinho durante este tempo no Brasil. Assim como também aos meus pais e irmãos por todo seu apoio mesmo fora da Colômbia.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, o Professor Doutor Mário Antônio Navarro da Silva por ter sempre confiança e apoio nos meus ideais como cientista, assim como por me permitir à oportunidade de estudar fora de meu país;

Ao meu co-orientador, o Doutor Ademir de Jesus Martins, por compartilhar seus conhecimentos e conselhos no desenvolvimento deste trabalho;

A minha esposa Paula Andrea Cárdenas Rojas, Licenciada em Letras (UQ-Colômbia), pela sua ajuda na correção e edição de todos meus textos científicos em todas as línguas que precisei: espanhol, inglês e até português;

Aos membros do LEMV-UFPR e Laficave-Fiocruz/RJ, pelos conselhos e ajudas prestados;

Às diferentes Secretarias Estaduais de Saúde pela coleta do material que fizeram parte de meu trabalho, sem as quais não poderia ter desenvolvido esta tese;

Ao Robson Costa da Silva, do Laboratório de Biologia Molecular de Insetos/IOF/Fiocruz, por me ceder gentilmente as células competentes de *Escherichia coli* DH5 α ;

Aos professores do programa de pós-graduação em entomologia da UFPR;

Ao CNPq, cuja bolsa possibilitou a realização deste projeto;

Aos membros da banca, que gentilmente cederam seu tempo e conhecimento para correções e aprimoramento deste trabalho.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação esquemática de uma sinapse nervosa, indicando as classes de inseticidas que atuam na transmissão axônica (PY e OC) e sináptica (OP, CA e SP). A seta dentro dos neurônios indica o sentido da transmissão do impulso nervoso. Na_v= Canal de sódio voltagem-dependente, PY= Piretróides, OC= organoclorados, OP= Organofosforados, CA= Carbamatos e SP= Espinosinas. 24
- Figura 2.** O canal de sódio voltagem-dependente, seus domínios (I-IV) e segmentos (S1-S6), com destaque nas mutações *kdr* identificadas em *Aedes aegypti* (A) e *Aedes albopictus* (B). * Mutações *kdr* exclusivas em *Aedes aegypti*; as mutações sublinhadas são aquelas vinculadas com resistência. Figura adaptada de Rinkevich et al. (2013)..... 30
- Figura 3.** Frequência e distribuição dos alelos *kdr* Na_v^S, Na_v^{R1} e Na_v^{R2} Das populações de *Aedes aegypti* da Colômbia (A) e Brasil (B). As cidades de coleta e o ano de amostragem (entre parêntesis) são colocados em cada mapa. No mapa da Colômbia é destacado o Departamento do Quindío com cada uma das cidades de amostragem. No mapa do Brasil, são destacadas todas suas regiões: N= Norte, CW= Centro-Oeste, NE= Nordeste, SE= Sudeste, S= Sul..... 54
- Figura 4.** Frequência e distribuição dos alelos *kdr* Na_v^S, Na_v^{R1} e Na_v^{R2} das populações de *Aedes aegypti* do Foz de Iguaçu (B), Brasil (A). Os estratos de amostragem e as principais rodoviárias da cidade se apresentam no mapa..... 55
- Figura 5.** Diversidade nucleotídica no segmento IIS6 do *Nav* em *Aedes aegypti*. Alinhamento ClustalW para comparar os haplótipos encontrados neste estudo (H1-15), com outras sequências genômicas de *Aedes aegypti* disponíveis no GenBank de Brasil, América do Sul [GenBank: FJ479609 e FJ479611], El Salvador, América Central [GenBank: LC036550], Gana, África Ocidental [GenBank: LC036551], Quênia, África Oriental [GenBank: LC085630], Malavi, África do Sul [GenBank: LC050219], Índia, Sul da Ásia [GenBank: KM677321] e Indonésia,

Sudeste Asiático [GenBanK: KJ957878]. A sequência traduzida de aminoácidos é representada pelas letras em azul, em relação ao primeiro nucleotídeo do seu códon correspondente. Os nucleotídeos em letras maiúsculas correspondem à região de codificação (Exões 20 e 21) e aqueles em letras minúsculas referem-se ao intron, com a numeração no alinhamento dentro de parênteses no topo de cada bloco, e sublinhado as sequências referentes às posições dos *primers*. Os sítios invariáveis estão indicados com pontos, caso contrário, com o nucleotídeo alternativo e os gaps com (-). Os quadrados indicam os códons em que as mutações *kdr* 1011 e 1016 estão presentes em *Aedes aegypti*. 56

Figura 6. Análise de máxima verossimilhança de *Aedes aegypti*. A história evolutiva foi inferida usando o modelo Hasegawa-Kishino-Yano + Gamma distributed (HKY+G) tal como sugerido pelo jmodelTest 2.1.10. A árvore de máxima verossimilhança foi obtido usando o algoritmo *Subtree-Pruning-Regrafting - Extensive* (SPR NÍVEL 5). A árvore está desenhada à escala, com comprimentos dos ramos calculados usando o método *Very Strong*. Os percentuais de árvores idênticas, em que as sequências associadas agrupadas no teste *Bootstrap* (1,000 replicas) são apresentadas ao lado dos ramos. Os haplótipos deste trabalho são apresentados na árvore em vermelho. 59

Figura 7. Diversidade nucleotídica no segmento IIIS6 do *Na_v* em *Aedes aegypti*. Alinhamento ClustalW para comparar os haplótipos encontrados neste estudo (H16 e H17), com outras sequências genômicas de *Aedes aegypti* disponíveis no GenBanK de Brasil [GenBanK: KF527414] e Colômbia (GenBanK: KP861896), América do Sul, Gana, África [GenBanK: LC050217], Myanmar, Sudeste Asiático [GenBanK: AB914688] e Índia, Sul da Ásia [GenBanK: KM677276]. A sequência traduzida de aminoácidos é representada pelas letras em azul, em relação ao primeiro nucleotídeo do seu códon correspondente. Os nucleotídeos em letras maiúsculas correspondem à região de codificação (Exões 30 e 31) e aqueles em letras minúsculas referem-se ao intron, com a numeração no alinhamento dentro de parênteses no topo de cada bloco, e um sublinhado simples nas sequências se refere às posições dos *primers*. Os sítios invariáveis estão indicados com pontos, caso

contrário, com o nucleotídeo alternativo e os gaps com (-). O sítio *kdr* 1534 é indicado com um quadrado. 60

Figura 8. Visualização dos produtos de amplificação para os sítios *kdr* 1016 e 1534 em uma eletroforese em gel de poliacrilamida a 10%, sob condições de corrida: 170 V/45'. No gel, são apresentados todos os genótipos observados para cada sítio *kdr*. para o sítio *kdr* 1016, os produtos per **A**, **B** e **C** correspondem aos genótipos: Heterozigoto ($\text{Val}^+/\text{Ile}^{kdr}$), Selvagem ($\text{Val}^+/\text{Val}^+$) e Mutante ($\text{Ile}^{kdr}/\text{Ile}^{kdr}$). Por sua parte, para o sítio *kdr* 1534, **D**, **E** e **F** aos genótipos: Heterozigoto ($\text{Phe}^+/\text{Cys}^{kdr}$), Selvagem ($\text{Phe}^+/\text{Phe}^+$) e Mutante ($\text{Cys}^{kdr}/\text{Cys}^{kdr}$). O DNA *ladder* foi utilizado como indicador de peso molecular (PB= Pares de bases). 61

Figura 9. Frequências alélicas para o sítio 1534 das populações de *Aedes albopictus* do Brasil. Cidades/Estados de coleta e ano de amostragem (entre parêntesis) são colocados no mapa. É destacado o mapa do Paraná mostrando suas múltiplas cidades de coleção. 67

Figura 10. Diversidade nucleotídica no segmento IIS6 do *Na_v* em *Aedes albopictus*. Alinhamento ClustalW para comparar os haplótipos encontrados neste estudo (IIS6_HAP1 [KX281169] e IIS6_HAP2 [KX281170]), com outras sequencias genômicas de *Aedes albopictus* disponíveis no GenBanK de Brasil [GenBanK: FJ479615], Malásia [GenBanK: KC152045] e Japão [GenBanK: AB827810]. um haplótipo de *Aedes aegypti* [FJ479611] foi incluso como uma questão de comparação, mas o intron foi negligenciado para não perturbar o alinhamento. A sequência AB827810 não cobre toda a extensão deste alinhamento. A sequência traduzida de aminoácidos é representada pelas letras em azul, em relação ao primeiro nucleótido do seu codon correspondente. Os nucleótidos em letras maiúsculas correspondem à região de codificação (Exões 20 e 21) e aqueles em letras minúsculas referem-se ao intron, com a numeração no alinhamento dentro de parênteses no topo de cada bloco, e sublinhado sequências referentes às posições dos *primers*. Os sítios invariáveis estão indicados com pontos, caso contrário, com o nucleotídeo alternativo e os *gaps* com (-). Os quadrados indicam os códons em

que os locais das mutações *kdr* 989, 1011 e 1016 estão presentes em *Aedes aegypti*. 68

Figura 11. Diversidade nucleotídica no segmento IIIS6 do *Na_v* em *Aedes albopictus*.

Alinhamento ClustalW para comparar os haplótipos encontrados neste estudo 1534Phe [KX371864] e 1534Cys [KX371865]), com outras sequencias genômicas de *Aedes albopictus* disponíveis no GenBanK: Um DNA genômico [GenBanK: AB827824], um mRNA [GenBanK: KC152046 e AY663382] e um haplotipo do *Aedes aegypti* [GenBanK: KF527415]. As sequências importadas de *Aedes albopictus* não cobrem toda a extensão deste alinhamento. A sequência traduzida de aminoácidos é representada pelas letras em azul, em relação ao primeiro nucleótido do seu codon correspondente. Os nucleótidos em letras maiúsculas correspondem à região de codificação (Exões 30 e 31) e aqueles em letras minúsculas referem-se ao intron, com a numeração no alinhamento dentro de parênteses no topo de cada bloco, e um sublinhado simples nas sequencias se refere às posições dos *primers*. O duplo sublinhado indica a região de anelamento para os *primers* da AS-PCR. Os sítios invariáveis estão indicados com pontos, caso contrário, com o nucleotídeo alternativo e os gaps com (-). O sítio *kdr* 1534 é indicado com um quadrado. 69

Figura 12. Visualização dos produtos de amplificação para o sítio *kdr* 1534 em uma

eletroforese em gel de poliacrilamida a 10%, sob condições de corrida: 170 V/45'. No gel, são apresentados somente os genótipos observados, o genótipo Selvagem (**A**= Phe⁺/Phe⁺) e o Heterozigoto (**B**= Phe⁺/Cys^{*kdr*}). O DNA *ladder* foi utilizado como indicador de peso molecular (PB= Pares de bases). 70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Inseticidas recomendados pela WHO para o controle químico de insetos de importância médica.....	25
Tabela 2. Informação das sequências entre os Exón 20 e 21 para o segmento IIS6 do <i>Na_v</i> de <i>Aedes aegypti</i> utilizadas para a análise filogenética. Fonte: Kawada et al. (2016).....	38
Tabela 3. Dados demográficos, número de casos de dengue e numero de <i>Aedes aegypti</i> / <i>Aedes albopictus</i> obtidos das localidades amostradas. Os dados referentes para Barcelona na Colômbia estão inclusos dentro das populações de Calarcá, por ele ser parte desta municipalidade.	47
Tabela 4. Distribuição e frequência dos haplótipos (H) observados nos segmentos IIS6 (H1-15) e IIS6 (H16-17) do <i>Na_v</i> em populações de <i>Aedes aegypti</i> da Colômbia e Brasil.	48
Tabela 5. Sítios variáveis em 15 haplótipos (H) do segmento IIS6 do <i>Na_v</i> em populações de <i>Aedes aegypti</i> da Colômbia e Brasil. Os nucleotídeos em letras maiúsculas correspondem à região de codificação (Exões 20 e 21) e aqueles em letras minúsculas referem-se ao intron. Os sítios invariáveis estão indicados com pontos, caso contrário, com o nucleotídeo alternativo e os gaps com (-). Os nucleotídeos em preto referem-se à posição das mutações <i>kdr</i>	49
Tabela 6. Resultado seleção do modelo de evolução nucleotídica (entre 24 modelos) usando o parâmetro Akaike (AICc).	52
Tabela 7. Frequências genotípicas <i>Na_v</i> , considerando-se os sítios 1016 e 1534, de populações de <i>Aedes aegypti</i> da Colômbia e Brasil.	53
Tabela 8. Dados demográficos, número de casos de dengue e numero de <i>Aedes aegypti</i> / <i>Aedes albopictus</i> obtidos das localidades amostradas.	64

Tabela 9. Distribuição e frequência dos haplótipos dos segmentos IIS6 e IIS6 do <i>Nav</i> do <i>Aedes albopictus</i> do Brasil.	65
--	----

Tabela 10. Frequência genotípica do sítio 1534 do <i>Nav</i> das oito populações de <i>Aedes albopictus</i> do Brasil.	66
--	----

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

Aaa: *Aedes aegypti aegypti*;

Aaf: *Aedes aegypti formosus*;

AS-PCR: PCR alelo específica;

CA: Carbamatos;

H: Haplótipos;

HI: Índice de infestação;

HW: Equilíbrio de Hardy-Weinberg;

kdr: Resistência *knockdown*;

LI: Índice larval;

LIRAA: Levantamento Rápido do Índice de Infestação de *A. aegypti*;

MoReNAa: Rede Nacional de Monitoramento da Resistência de *A. aegypti*;

Nav: Canal de sódio voltagem dependente;

Nav: Gene do canal de sódio voltagem-dependente

OC: Organoclorados;

OP: Organofosforados;

OPS: Organização Pan-americana da Saúde;

pb: Pares de bases;

PY: Piretróides;

RIDL: *Realease of Insect Carrying a Dominant Lethal gene*;

SP: Espinosinas;

SNP: Polimorfismo de Nucleotídeo Único;

WHO: Organização Mundial da Saúde;

WHOPES: *World Health Organization Pesticide Evaluation Scheme*.

SUMÁRIO

RESUMO	14
ABSTRACT	15
1. INTRODUÇÃO	16
2. JUSTIFICATIVA	32
3. OBJETIVOS.....	34
3.1. OBJETIVO GERAL	34
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	35
4.1. Amostragem das populações de <i>A. aegypti</i>	35
4.2. Amplificação, clonagem e sequenciamento dos segmentos IIS6 e IIIS6 do <i>Na_v</i> em <i>A. aegypti</i>	36
4.3. Genotipagem dos sítios 1016 e 1534 em <i>A. aegypti</i>	39
4.4. Amostragem das populações de <i>A. albopictus</i>	41
4.4. Amplificação, clonagem e sequenciamento dos segmentos IIS6 e IIIS6 do <i>Na_v</i> em <i>A. albopictus</i>	41
4.5. Genotipagem do sítio 1534 em <i>A. albopictus</i>	42
5. RESULTADOS	44
5.1. Populações de <i>A. aegypti</i>	44
5.2. Populações de <i>A. albopictus</i>	62
6. DISCUSSÃO	71
7. CONCLUSÕES	80
8. REFERÊNCIAS	81

RESUMO

O canal de sódio voltagem-dependente (Na_V) é fundamental para a sinalização elétrica no sistema nervoso e é o sítio-alvo para Piretróides (PY) e DDT. A resistência *knockdown* (*kdr*), causada por alterações no Na_V , é portanto, um dos mecanismos que confere resistência a estes inseticidas. Pelo menos 12 mutações não sinônimas foram relatadas em nove códons diferentes no gene do Na_V em *Aedes aegypti*, a maioria delas nos segmentos IIS6 e IIIS6. A mutação *kdr* Phe1534Cys no segmento IIIS6 é a mais prevalente em todo o mundo, e também foi encontrada em populações asiáticas de *Aedes albopictus* resistente aos PY. Aqui foi investigada a ocorrência, frequência e distribuição de mutações *kdr* presentes nos segmentos IIS6 e IIIS6 do Na_V em populações naturais de *A. aegypti* da Colômbia e Brasil e de *A. albopictus* do Brasil. O DNA de 13 populações de *A. aegypti* da Colômbia (quatro) e Brasil (nove) e nove de *A. albopictus* do Brasil foram individualmente extraídos e agrupados por Estado (*A. aegypti*) e localidade (*A. albopictus*), amplificados, clonados e sequenciados para os correspondentes segmentos IIS6 e IIIS6 do Na_V . Adicionalmente, os indivíduos de cada espécie, para cada localidade foram individualmente genotipados via PCR alelo específica (AS-PCR) para se obter as frequências genotípicas e alélicas para os sítios *kdr* 1016 e 1534 para *A. aegypti*, e 1534 para *A. albopictus*. A área urbana de Foz do Iguaçu foi dividida por estratos, de forma que as frequências genotípicas e alélicas foram então analisadas separadamente e, em seguida, como uma unidade. Nas populações de *A. aegypti* de ambos os países foram detectados três polimorfismos não sinônimos no Na_V (Ile1011Met, Val1016Ile no segmento IIS6 e Phe1534Cys no IIIS6). Já em *A. albopictus* apenas a mutação Phe1534Cys foi evidenciada em populações brasileiras dos Estados de Paraná (PR) e Rondônia (RO). Substituições restritas ao sítio 1534 (Na_V^{R1}) e substituições simultâneas em ambos os sítios 1016 e 1534 (Na_V^{R2}) foram observadas em todas as populações de *A. aegypti* da Colômbia e Brasil. O alelo *kdr* Na_V^{R1} foi detectado em todas as localidades da Colômbia e Brasil. No Brasil, o alelo *kdr* Na_V^{R2} foi mais frequente nas localidades da região Sul e Centro-Oeste. Em Foz do Iguaçu, o alelo *kdr* Na_V^{R2} estava distribuído nos estratos em frequências $\geq 55\%$, com exceção do estrato 1. Por sua parte, em *A. albopictus*, o alelo 1534Cys^{*kdr*} variou entre 3% (Marilena/PR e Porto Velho/RO) e 10% (Foz do Iguaçu/PR). Esta é a primeira evidência de ocorrência e distribuição de uma mutação *kdr* em *A. albopictus* para América do Sul. Os resultados aqui apresentados sugerem a necessidade de um uso integrado apropriado de inseticidas na Colômbia e no Brasil, assim como a inclusão de *A. albopictus* no monitoramento da resistência aos inseticidas, a fim de manter os compostos químicos como uma ferramenta de controle de vetores quando necessário.

Palavras-chave: chikungunya, dengue, piretróides, controle vetorial, canal de sódio voltagem-dependente, Zika.

ABSTRACT

The voltage-gated sodium channel (Na_V) is critical for electrical signaling in the nervous system and is the target site for Pyrethroids (PY) and DDT. The *knockdown* resistance (*kdr*) caused by changes in Na_V , is one of the mechanisms that confers resistance to those insecticides. At least 12 non-synonymous mutations were reported at nine different codons in the Na_V gene in *Aedes aegypti*, most of them in the segments IIS6 and IIIS6. The *kdr* mutation Phe1534Cys in IIIS6 Na_V segment is the most prevalent throughout the world, and has also been found in Asian *Aedes albopictus* populations resistant to PY. Here, we studied the occurrence, frequency and distribution of *kdr* mutations present in the IIS6 and IIIS6 Na_V segments in natural populations of *A. aegypti* from Colombia and Brazil and *A. albopictus* from Brazil. The DNA from 13 *A. aegypti* populations from Colombia (four) and Brazil (nine) and nine from *A. albopictus* from Brazil were individually extracted and grouped by State (*A. aegypti*) and location (*A. albopictus*), amplified, cloned and sequenced to the corresponding IIS6 and IIIS6 Na_V segment. In addition, individuals from each location for each species were individually genotyped using PCR specific allele (AS-PCR) for obtaining the genotypic and allelic frequencies for the *kdr* sites 1016 and 1534 for *A. aegypti* and 1534 for *A. albopictus*. The urban area of Foz do Iguaçu was divided by strata, and genotypic and allelic frequencies were analyzed, first by strata and then as a single unit. In *A. aegypti* populations from both countries three non-synonymous polymorphisms (Ile1011Met, Val1016Ile in IIS6 and Phe1534Cys in IIIS6 Na_V segment) in the Na_V gene were detected. However, in *A. albopictus*, only the Phe1534Cys *kdr* mutation was evidenced in Brazilian populations' from the states of Paraná (PR) and Rondônia (RO). Restricted substitutions to 1534 site (Na_V^{R1}) and simultaneous substitutions at both 1016 and 1534 sites in (Na_V^{R2}) were observed in all *A. aegypti* populations from Colombia and Brazil. The Na_V^{R1} *kdr* allele was detected in all locations from Colombia and Brazil. In Brazil, the Na_V^{R2} *kdr* allele was more frequent in the localities from the South and Central West. In Foz do Iguaçu, the Na_V^{R2} *kdr* allele was spread in all strata in frequencies $\geq 55\%$, except for the stratum 1. On the other hand, in *A. albopictus*, the allele 1534Cys^{*kdr*} ranged from 3% (Marilena/PR and Porto Velho/RO) 10% (Foz do Iguaçu/PR). This is the first evidence of occurrence and distribution of *kdr* mutation in *A. albopictus* from South America. The results presented here suggest the need for an appropriate integrated use of insecticides in Colombia and Brazil, as well as the inclusion of *A. albopictus* monitoring to insecticides resistance in order to maintain the chemical compounds as an efficient vector control tool when necessary.

Keywords: chikungunya, dengue, pyrethroid resistance, vector control, voltage-gated sodium channel, Zika.

1. INTRODUÇÃO

As febres chikungunya, dengue e mais recentemente a Zika, são doenças causadas por arbovírus RNA das famílias Togaviridae (chikungunya) e Flaviviridae (dengue e Zika), que estão aumentando as preocupações globais em saúde pública devido à rápida propagação geográfica (Cardoso et al. 2015; Higgs & Vanlandingham 2015). Entre essas doenças, a dengue é a infecção viral mais prevalente em humanos, causando cerca de 100 milhões de infecções anuais aparentes e deixando quase a metade da população do mundo sob risco (Messina et al. 2014). A transmissão da dengue ocorre em mais de 120 países, a maioria em regiões tropicais e subtropicais (Brady et al. 2012). Nas Américas, a doença tem se disseminado com surtos cíclicos, ocorrendo a cada 3-5 anos. (WHO 2013). Particularmente, na Colômbia e no Brasil, a dengue é a arbovirose mais prevalente, causando separadamente epidemias de cada um dos quatro sorotipos identificados (DENV-1, 2, 3 e 4) (Castrillón et al. 2015; Mendonça & Dutra 2009).

Atualmente em ambos os países circulam os quatro sorotipos de dengue (Instituto Nacional de Salud 2016b; Ministério da Saúde 2016d). No entanto, um quinto sorotipo (DENV-5) da doença, que circula naturalmente entre as populações de macacos na floresta de Sarawak na Malásia, foi identificado após um surto de dengue no mesmo estado (Normile 2013). Este achado complicaria o quadro atual da dengue no mundo (Mustafa et al. 2015), fazendo-se necessário o monitoramento molecular constante dos sorotipos circulantes tanto na Colômbia quanto no Brasil, a fim de se detectar oportunamente o possível ingresso deste novo sorotipo.

Na Colômbia, país politicamente formado por 32 departamentos e geograficamente por cinco regiões (Andina, Caribe, Amazônica, Pacífica e Orinoquia) (DANE 2016), historicamente 60% dos casos da dengue entre 2004-2013 foram apresentados nos departamentos de Santander (2.071.016 hab.), Norte de Santander (1.367.716 hab.), Antioquia (6.534.764 hab.), Huila (1.168.910 hab.), Tolima (1.412.230 hab.), Cundinamarca (2.721.368 hab.; região Andina), Valle del Cauca (4.660.438 hab.; região Pacífica), Casanare (362.698 hab.; região Orinoquia) e Atlântico (2.489.709 hab.; região Caribe) (SIVIGILA 2016), sendo 2010, o ano com maior número de casos de dengue (>150 mil) registrados no país (Castrillón et al. 2015). Contudo, o departamento do Quindío (568.473 hab.; região Andina), um dos menores do país, entre 1990 e 2010 registrou mais de 41 mil casos de dengue, sendo 81,7% destes nos municípios de

Armênia (57,8%), Calarcá (14,9%) e Montenegro (9,0%) (Muñoz 2015), localidades estudadas neste documento. O Brasil é geopoliticamente formado por 26 Estados, agrupados em cinco regiões geográficas (Centro-Oeste, Nordeste, Norte, Sudeste e Sul) (IBGE 2016), e tem sido especialmente vulnerável às epidemias de dengue, já que desde 2001 e pelo menos até 2011, 60% dos casos registrados na América Latina foram registrados no país (Dick et al. 2012). No Brasil, os dados históricos de dengue por regiões entre 1990-2014, indicam que a região Centro-Oeste tem registrado a maior incidência da doença, seguida do Nordeste, Sudeste, Norte e Sul (Ministério da Saúde 2016b), sendo 2015, o ano de maior surto no país, com mais de 1.5 milhões de casos notificados (Ministério da Saúde 2015b).

O chikungunya, um arbovírus originária da África Subsaariana, foi inicialmente identificada no sudeste da Tanzânia (África) após uma epidemia entre 1952-1953 (Simon et al. 2008). Desde sua descoberta, quatro genótipos têm sido descritos: o Centro-Oriental-África do Sul, o Oeste Africano, o Asiático e o Oceano Índico, cada um deles indicando a provável origem geográfica e local de transmissão (Weaver 2014). Na África, as epidemias causadas pelo chikungunya tinham sido escassas (Weaver & Forrester 2015). No entanto, a partir de 2006 foram registradas epidemias importantes desta doença na África, as Ilhas do Oceano Índico, Austrália e Sudeste Asiático, com mais de 1,25 milhões de casos registrados nesses países (Charrel et al. 2007; Schuffenecker et al. 2006; Yergolkar et al. 2006). Apesar de a chikungunya representar uma doença endêmica em países da África, Ásia e Oceania, nas Américas é considerada uma doença emergente (Higgs & Vanlandingham 2015). Nas Américas, os primeiros casos de chikungunya foram registrados em 2013 nas Ilhas do Caribe. Posteriormente, em 2014, o vírus espalhou-se em todo o continente (incluindo Colômbia e Brasil), apresentando-se mais de 580 mil casos registrados (Petersen & Powers 2016). Em 2015, a Organização Pan-americana da Saúde (OPAS) notificou a presença de mais de 693 mil casos de chikungunya nas Américas, a maioria deles na Colômbia (>50%) (WHO 2016).

Na Colômbia, o primeiro caso importado do chikungunya foi registrado em julho de 2014, em Cali, Valle del Cauca, em uma pessoa proveniente da República Dominicana. Já em setembro de 2014 o primeiro caso autóctone da doença foi registrado no município de Mahates, Bolívar; aparentemente originado por migração de pessoas infectadas na Venezuela (Instituto Nacional de Salud 2015a). No final daquele ano, na

semana epidemiológica 45 em novembro, foram registrados na Colômbia mais de 350 mil casos (Instituto Nacional de Salud 2015b), o que representou mais de 50% dos casos registrados nas Américas (WHO 2016). Análises moleculares em pacientes que manifestaram sintomas de chikungunya entre 2014-2015 indicam que as epidemias presentes na Colômbia estão relacionadas ao genótipo Asiático (Laiton-Donato et al. 2016).

No Brasil, em julho de 2014 foram registrados os primeiros casos importados da doença. Posteriormente em setembro, registrou-se o primeiro caso com transmissão autóctone no estado do Amapá, atribuído ao genótipo Asiático (Nunes et al. 2015). No mesmo mês e ano, em Feira de Santana, BA, outro surto foi registrado, mas, desta vez relacionado com um genótipo distinto do primeiro, o genótipo Centro-Oriental-África do Sul (Azevedo et al. 2015; Nunes et al. 2015). No final de 2014 foram registrados no país mais de 3.600 casos distribuídos nos estados da Bahia, Amapá, Roraima, Mato Grosso do Sul, e Distrito Federal; uma cifra que foi incrementada no ano seguinte, onde se registrou mais de 15 mil casos da doença (Ministério da Saúde 2015a).

Sem ainda superar a crise causada pelo ingresso do vírus chikungunya em 2015 nas Américas, uma terceira arbovírose, a Zika, passa ser registrada no continente com graves e severas consequências para a saúde pública mundial (Ministério da Saúde 2016a; Rodríguez-Morales & Willamil-Gómez 2016). Inicialmente, a Zika estava associada com sintomas leves (i.e., dor de cabeça, erupção cutânea, dor nas articulações, conjuntivite). No entanto, a associação desta doença com o aumento de casos de microcefalia (fato nunca antes descrito) em neonatos brasileiros (Martines et al. 2016; OPS 2016) e a síndrome de Guillain-Barre tanto no Brasil quanto na Polinésia Francesa (Brasil et al. 2016; Cao-Lormeau et al. 2016), levaram a Organização Mundial da Saúde (OMS) a declarar a doença como uma nova emergência sanitária (OPS 2016). Em ambos os casos, a microcefalia e a síndrome de Guillain-Barre, afetam de forma irreversível o sistema nervoso. A microcefalia é uma malformação neonatal em que o tamanho de cabeça é menor em relação com o tamanho padrão de outras crianças da mesma idade, tamanho e sexo (OMS 2016a), e a síndrome de Guillain-Barre, uma rara condição na qual o sistema imune do paciente ataca os nervos periféricos (OMS 2016b).

O Zika, um arbovírus da mesma família do vírus da dengue, possui atualmente duas linhagens reconhecidas, a Africana e a Asiática, ambas relacionadas com o local de

origem e transmissão (Rodriguez-Morales 2015). O Zika foi identificado pela primeira vez em sangue de macacos do gênero *Rhesus* em 1947, na Uganda, África (Dick et al. 1952). Posteriormente em 1952, apareceram os primeiros registros em humanos da Uganda e Tanzânia, mas o isolamento do vírus somente foi possível em 1968 a partir do sangue de pacientes da Nigéria (Hayes 2009).

Em 2007, o primeiro surto da doença é registrado nos Estados Federativos da Micronésia na Ásia (Duffy et al. 2009). Registros de casos da doença nas Ilhas Pacíficas não haviam sido reportados até a sua aparição na Polinésia Francesa em 2013 e subsequente sua disseminação ao longo do Pacífico (Cao-Lormeau & Musso 2014; Musso et al. 2014). Em 2014, foi identificado o primeiro caso da doença nas Américas, particularmente no Chile. Na sequência, em 2015 no Brasil, 17 casos foram confirmados em três estados: Bahia (8), Rio Grande do Norte (8) e São Paulo (1) (Zanluca et al. 2015). No entanto, o fato mais preocupante foi à associação da Zika com o aumento de casos de microcefalia em neonatos brasileiros, cujas mães tinham contraído previamente a doença (OPS 2016). Dados epidemiológicos até o mês de abril/2016 no Brasil registraram 1.198 casos confirmados de microcefalia distribuídos nas cinco regiões do país (Ministério da Saúde 2016c), assim como, 39.993 casos de Zika distribuídos em 27 estados das regiões Norte, Nordeste, Sul e Sudeste (Ministério da Saúde 2016a).

Poucos meses transcorreram entre os primeiros registros de Zika no Brasil e as primeiras notificações da doença na Colômbia. Nesta, os primeiros casos da doença foram identificados em Cartagena e Turbaco (áreas turísticas) no departamento de Bolívar, procedentes de turistas brasileiros (Rodriguez-Morales et al. 2016a). Atualmente na Colômbia, a circulação autóctone do vírus Zika está confirmada na maioria dos departamentos, com o registro de 88 mil casos da doença e mais de 4.800 casos de Zika em mulheres então gestantes, até maio de 2016 (Instituto Nacional de Salud 2016a).

Atualmente, na América Latina os vírus da dengue, chikungunya e Zika estão circulando simultaneamente (Christofferson 2016), um fato preocupante tanto para Colômbia e Brasil, devido às assimetrias socioeconômicas da população em ambos os países, à dificuldade para diagnosticar as doenças pela presença de quadros clínicos semelhantes (Moulin et al. 2016), e a possibilidade de co-infecção múltipla (Rodriguez-

Morales et al. 2016b); um fato já observado na Colômbia (Villamil-Gómez et al. 2016). Estes arbovirus são transmitidos pela picada das fêmeas de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) (Weaver 2014; WHO 2013; Yakob& Walker 2016) e *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse, 1894) (Grard et al. 2014; Vazeille et al. 2011; Whitehorn et al. 2015) infectadas, onde o homem é o principal hospedeiro de expansão viral durante os surtos das doenças.

Os mosquitos *A. aegypti* e *A. albopictus* são espécies pertencentes à família Culicidae, superfamília Culicomorpha, subfamília Culicinae e tribo Aedini (Lambkin et al. 2013; Reidenbach et al. 2009; Reinert et al. 2009). Apesar de recentemente as espécies de *Aedes* terem sofrido mudanças taxonômicas (com a elevação do subgênero *Stegomyia* ao nível de gênero) (Reinert et al. 2009), neste documento será mantida a denominação *A. aegypti* e *A. albopictus* por serem amplamente utilizadas no âmbito da saúde pública.

A. aegypti, mosquito de origem africana, e *A. albopictus*, de origem asiática também conhecida como tigre-asiático, são espécies consideradas invasoras devido à colonização de diversas áreas por fora dos seus locais de origem (Kraemer et al. 2015b).

Na África, duas “formas” do *A. aegypti* s.l. são reconhecidas: *Aedes aegypti aegypti* (*Aaa*) e *Aedes aegypti formosus* (*Aaf*) (Mattingly 1967). *Aaa* é primariamente antropofílica com primazia para se reproduzir em habitats antrópicos. Por outro lado, *Aaf* prefere se alimentar de mamíferos não humanos e se reproduzir em ambientes de floresta (Mattingly 1957). *Aaf*, a forma ancestral do *A. aegypti* s.l., está confinada na África subsaariana, enquanto que, *Aaa* é mosquito globalmente distribuído para fora da África (Brown et al. 2011). Considera-se que *Aaa* tenha maior competência como o vetor mais eficiente dos vírus da dengue e febre amarela que *Aaf* (Failloux et al. 2002; Tabachnick et al. 1985). Contudo, análises filogenéticas moleculares usando quatro genes nucleares e 1.504 Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNP) sugerem que as populações deste vetor fora da África consistem em *Aaa* (Brown et al. 2014). O termo *A. aegypti* s.l., foi proposto a finais de 1950 devido às altas frequências de *Aaa* observadas em populações de *A. aegypti* da África Oriental nas moradias humanas (dentro e fora) quando comparadas com as florestas adjacentes (Mattingly & Bruce-Chwatt 1954; McClelland 1960).

Nas Américas, *A. aegypti* é o vetor primário de dengue, chikungunya e Zika (Weaver 2014; WHO 2013; Yakob & Walker 2016). Apesar de *A. albopictus* nas Américas também apresentar competência vetorial para esses arbovírus, até o momento não há evidências da espécie ter papel relevante na transmissão (Chouin-Carneiro et al. 2016; Ibáñez-Bernal et al. 1997). No entanto, na Ásia e África, o tigre-asiático é um vetor relevante (Dubrulle et al. 2009; Grard et al. 2014; Ravi 2006; Vazeille et al. 2011; Wong et al. 2013), de forma que seu papel na transmissão nas Américas não pode passar inadvertido.

A. aegypti e *A. albopictus* tem se dispersado desde seu local de origem e colonizado todos os continentes com exceção da Antártica (Kraemer et al. 2015a). A dispersão destas espécies ao longo do mundo está diretamente relacionada com as atividades antrópicas (i.e., comércio, turismo) oferecidas pelas populações humanas (Bonizzoni et al. 2013; Powell & Tabachnick 2013). *A. aegypti* está presente e distribuído nas regiões tropicais e subtropicais, enquanto que o tigre-asiático, além dessas regiões, também está em zonas temperadas (Kraemer et al. 2015b). *A. aegypti* tem o homem como fonte preferencial de alimentação e as áreas urbanas como principal área de reprodução (Brown et al. 2011). Já o *A. albopictus* inclui tanto ao homem quanto outros vertebrados (i.e., cachorros, gatos, pássaros, répteis) como fonte de alimentação e ocupa ambientes periurbanos, rurais, semi-rurais e silváticos, como locais primários de distribuição e reprodução (Bonizzoni et al. 2013). Entretanto, nas áreas urbanas, tanto o *A. aegypti* quanto o *A. albopictus*, podem apresentar distribuição simpátrica, compartilhando as mesmas fontes de alimentação e reprodução (Rey & Lounibos 2015).

A. aegypti prefere por seus ovos em recipientes artificiais (i.e., pneus, latas, vasos de plantas, caixas de água) contendo água parada com pouca matéria orgânica, enquanto que, *A. albopictus*, apesar de também ovipor em recipientes artificiais, tem preferência pelos naturais (i.e., ocos de árvores, cascas de frutas, bromélias, entrenós de bambu) (Gonzalez et al. 2016). Assim como *A. aegypti*, os ovos de *A. albopictus* podem resistir longos períodos de dessecação, permitindo a sobrevivência da sua prole frente condições adversas (Rey & Lounibos 2015). No entanto, nas regiões temperadas, *A. albopictus* utiliza a estratégia da diapausa nos seus ovos para conseguir sobreviver em condições climáticas mais adversas as quais *A. aegypti* seria incapaz de resistir (Smith et al. 2016). Por esse motivo, aquela espécie consegue sobreviver em climas frios (entre

5^oC até 11^oC), como tem sido observado na Ásia e América do Norte (Nawrocki & Hawley 1987).

A incidência de *A. aegypti* e *A. albopictus* está relacionada aos fatores climáticos (i.e., temperatura, pluviosidade) que influenciam sua abundância e distribuição (Brady et al. 2013). Sob condições climáticas favoráveis, as duas espécies mostram um *fitness* reprodutivo maior, permitindo rapidamente incrementar seu tamanho populacional e, consequentemente, aumentando as chances de surtos epidêmicos de arboviroses (Brady et al. 2014). Quando ambas as espécies competem interespecificamente pelos mesmos locais de reprodução, não existem informações conclusivas sobre o deslocamento das espécies (Rey & Lounibos 2015). Por exemplo, estudos em áreas urbanas da Ásia indicam que *A. aegypti* pode substituir o *A. albopictus* (Gilotra et al. 1967; Moore & Fisher 1969), enquanto que, na América do Norte e Sul tem se observado que *A. albopictus* pode deslocar drástica e rapidamente as populações de *A. aegypti* (Braks et al. 2004; Juliano et al. 2004). No entanto, no Caribe e na África foi reportado que ambas as espécies conseguem coexistir, mesmo em áreas rurais (Bagny et al. 2009; Marquetti et al. 2008; Simard et al. 2005).

Acredita-se que o *A. aegypti* invadiu as Américas durante os séculos XV-XVII através do comércio humano (Lounibos 2002; Moore et al. 2013). A introdução do tigre-asiático nas Américas é mais recente e tem acontecido nas últimas três a quatro décadas, principalmente através do comércio de pneus seminovos (Bonizzoni et al. 2013). Nas Américas, os primeiros registros do tigre-asiático foram observados em meados de 1980 na América do Norte (Texas, USA) (Sprenger & Wuithiranyagool 1986), e na sequência, entre 1980 e 1990, na América Central (Ibanez-Bernal & Martinez-Campos 1994) e do Sul (Forattini 1986). Depois do estabelecimento das duas espécies nas áreas costeiras das regiões tropicais, subtropicais e temperadas, ambas as espécies se dispersaram ao interior do continente (Bonizzoni et al. 2013; Lounibos 2002).

Suspeita-se que a introdução do *A. aegypti*, tanto na Colômbia quanto no Brasil, tenha acontecido no período colonial (séculos: XVI a XIX) durante o comércio de escravos (Braga & Valle 2007b; OPS 1992). *A. albopictus*, foi detectado no Brasil em 1896 (Forattini 1986) e, posteriormente, em 1998 (Leticia, Amazonas, em limites fronteiriços com Tabatinga, Brasil) na Colômbia (Vélez et al. 1998). Os dados mais

recentes indicam que *A. aegypti* está presente na maioria do território de ambos os países (até os 2660 m de altitude) (Ruiz-López et al. 2016; WHO 2013), enquanto que, *A. albopictus*, está distribuído em algumas localidades da Colômbia (Rúa-Urbe et al. 2012) e em 24 das 27 unidades federativas, contendo 59% de todos os municípios do Brasil (Carvalho et al. 2014).

Vários estudos estão sendo realizados para o desenvolvimento de vacinas eficientes para o controle dessas arbovíroses, principalmente para a dengue (Kantor 2016). Desde julho de 2016, *Dengvaxia* (Sanofi Pasteur), a primeira vacina tetravalente para a dengue com 60% de eficácia, está liberada para uso no Brasil (Villar et al. 2015). No entanto, a eficácia da *Dengvaxia* foi considerada reduzida, de acordo com publicações recentes (Aguiar et al. 2016; Halstead & Aguiar 2016; Hladish et al. 2016). Além disso, apresentou efeitos colaterais em pessoas que nunca tiveram contato com o vírus dengue (Aguiar et al. 2016) e inconveniente para ser usada por estrangeiros visitantes, já que são necessárias três doses administradas ao longo de um ano (Halstead & Aguiar 2016). Paralelamente, pelo menos outras cinco vacinas candidatas estão em testes clínicos, com duas delas, TV003/TV005 (*National Institute of Allergy and Infectious Diseases* - NIAID e Butantã) e DENVax (Takeda) começaram a fase III (fase previa a liberação da vacina) no começo do 2016 (Schwartz et al. 2015).

Mesmo que a curto prazo estejam disponíveis no mercado vacinas eficazes e seguras contra dengue, chikungunya e Zika, o controle de *A. aegypti* e *A. albopictus* ainda será a forma mais simples, econômica e eficiente a fim de se reduzir o número de casos destas doenças. Para este fim, a eliminação ou vedação de locais de procriação das larvas e o uso de inseticidas para o controle das formas larvais e adultas são as formas atualmente empregadas em larga escala (WHO 2013).

Historicamente, quatro classes de inseticidas Organoclorados (OC), Piretróides (PY), Carbamatos (CA) e Organofosforados (OP), todos neurotóxicos, tem sido utilizados para diminuir o tamanho populacional de mosquitos pelos programas de controle vetorial (Baldacchino et al. 2015). Mais recentemente, estão disponíveis também as espinosinas (SP) (Valle et al. 2015). OC e PY agem no axônio, enquanto que OP, CA e SP, na fenda sináptica do sistema nervoso central dos insetos (Figura 1).

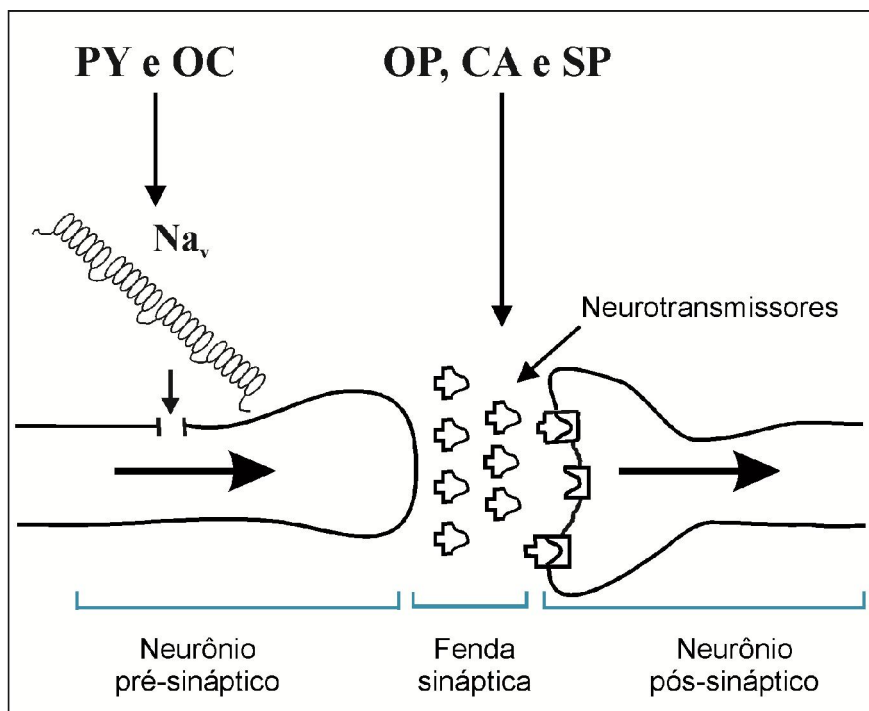


Figura 1. Representação esquemática de uma sinapse nervosa, indicando as classes de inseticidas que atuam na transmissão axônica (PY e OC) e sináptica (OP, CA e SP). A seta dentro dos neurônios indica o sentido da transmissão do impulso nervoso. Na_v = Canal de sódio voltagem-dependente, PY= Piretróides, OC= Organoclorados, OP= Organofosforados, CA= Carbamatos e SP= Espinosinas.

Na Colômbia e no Brasil, os ministérios de saúde de ambos os países utilizam apenas os inseticidas recomendados pela Organização Mundial da Saúde (WHO), indicados pelo grupo *World Health Organization Pesticide Evaluation Scheme* (WHOPES) (Braga & Valle 2007c; MinSalud et al. 2011). O WHOPES recomenda nove e cinco produtos para o controle de larvas e mosquitos adultos, respectivamente. Para o caso de adultos, quatro são PY e um OP (Tabela 1) (WHOPES 2013, 2014).

Tabela 1. Inseticidas recomendados pela WHO para o controle químico de insetos de importância médica.

Alvo	Princípio ativo	Ação	Classe
Larvas	Clorpirifos	Neurotóxico	OP
	Fention	Neurotóxico	OP
	Pirimifós-metil	Neurotóxico	OP
	Temephos	Neurotóxico	OP
	Spinosad	Neurotóxico	SP
	<i>Bacillus thuringiensis israelensis</i>	Lise do epitélio intestinal	Biolarvicida
	Diiflubenzuron	Regulador do desenvolvimento	Inibidor de síntese de quitina
	Novaluron	Regulador do desenvolvimento	Inibidor de síntese de quitina
	Priproxifen	Regulador do desenvolvimento	Inibidor de síntese de quitina
Adultos	Malathion	Neurotóxico	OP
	Deltametrina	Neurotóxico	PY
	Lambda-cialotrina	Neurotóxico	PY
	Permetrina	Neurotóxico	PY
	Transcifenotrina	Neurotóxico	PY

OP= Organofosforados, SP= Espinosinas, PY= Piretroídes. Adaptado de WHOPES (2013, 2014) e Valle et al. (2015).

O controle do *A. aegypti* foi institucionalizado de forma sistematizada na Colômbia e no Brasil, a partir do século XX, quando diversas epidemias de febre amarela urbana ocorreram em ambos os países levando à morte milhares de pessoas (Braga & Valle 2007b; Maestre 2012). O OC DDT foi o primeiro inseticida aplicado para controlar a malária e durante a campanha para a erradicação de *A. aegypti* realizada no início de 1950 (Boshell et al. 1986; Braga & Valle 2007a). Este inseticida foi banido no final dos anos 1960 devido aos resultados de resistência observados em todo o mundo (Brown 1986), assim como sua persistência no ambiente e ao seu acúmulo em tecidos de animais e humanos (Snedeker 2001; Turusov et al. 2002). No entanto, o DDT somente

foi proibido no Brasil em 1985 (Braga & Valle 2007b) e na Colômbia a partir de 1986 (Sánchez et al. 2006).

No Brasil desde 1967 e na Colômbia desde 1970, os OP Temephos (Brasil e Colômbia), Fenitrothion (Colômbia) e Malathion (Brasil e Colômbia) têm sido utilizados para o controle de larvas (Temephos e Fenitrothion) e adultos (Malathion) de *A. aegypti* (Braga et al. 2004; Motta-Sanchez et al. 1976; Ocampo et al. 2011). No entanto, a confirmação da resistência destes inseticidas desde 1995 no Brasil (Macoris et al. 1995) e 1996 na Colômbia (Suárez et al. 1996) motivou a adoção do uso de produtos de distintas classes para o controle de larvas e adultos de *A. aegypti*: passou-se a utilizar PY para o controle de adultos e Bti para o controle das larvas em localidades onde a resistência ao Temephos havia sido detectada (MinSalud et al. 2011; Saúde 2006). Contudo, devido à baixa persistência do Bti em condições de campo, ambos os países resolveram utilizar inibidores da síntese da quitina para o controle de larvas, sendo eles recomendados para seu uso no Brasil desde 2009 (Valle et al. 2015) e na Colômbia desde 2011 (MinSalud et al. 2011). Em 2009, devido ao aumento de casos de resistência aos PY no Brasil, o Programa Nacional de Controle de dengue recomendou a volta do OP Malathion, a fim de substituir os PY em todo o país (Valle et al. 2015).

Os PY constituem um grupo de compostos químicos estruturalmente modificados de piretrinas naturais [isolados das flores de *Tanacetum cinerariifolium* (Trevir) (Asteraceae; previamente classificada como *Chrysanthemum cinerariaefolium*) ou espécies relacionadas (DOLINŠEK et al. 2007)] catalogados em dois tipos: I e II (Ware & Whitacre 2004). Os PY tipo I e II se diferenciam pela ausência (tipo I; i.e., aletrina, permetrina, tetrametrina, cismetrina e d-fenotrina) ou presença (tipo II; i.e., cipermetrina, deltametrina, fenvalerato e fenpropanate) do grupamento alfa-ciano; este último, apresentando maior toxicidade em relação ao primeiro (Soderlund 2012; Ware & Whitacre 2004). De acordo com os sintomas em animais que receberam doses tóxicas agudas, os PY tipo I causam hiperexcitação, ataxia, tremores e paralisia (efeito conhecido como síndrome T), enquanto que o tipo II, hipersensibilidade, salivação e coreoatetose (efeito conhecido como síndrome CS) (Ray & Fry 2006).

Na busca de PY menos tóxicos para mamíferos, altamente eficazes em doses baixas para controlar insetos, porém com baixa persistência ambiental, os PY têm evoluído a partir de produtos de primeira geração (aletrina, 1949) para os de segunda [tetrametrina

(1965), resmetrina (1967), bioresmetrina (1967), bioaletrina (1969) e fonotrina (1973)], terceira [fenvalerato, permetrina (1972-1973)] e corrente quarta geração (desde 1975), que inclui cipermetrina, deltametrina, lambda-cialotrina e outros, todos estes fotoestáveis, com baixa volatilidade e prolongado efeito residual, que cumpram os requisitos desejados (Ware & Whitacre 2004).

Em todo o mundo, os PY são a classe mais comum de inseticida utilizado para o controle de vetores (na forma adulta) relevantes em saúde pública, devido à sua eficácia e segurança (Van den Berg et al. 2012). Em situações de epidemia, é recomendado utilizar esse inseticida em grande escala (WHO 2013). No entanto, os PY (i.e., inseticidas domésticos, repelentes e mosquiteiros impregnados) também estão disponíveis para o cidadão como produtos de uso no interior dos domicílios. Com efeito, o uso intensivo e prolongado de PY tanto pelos programas de controle vetorial quanto pelo cidadão, vem ampliando o processo de seleção das populações de *Aedes* spp. resistentes aos PY (Smith et al. 2016; Vontas et al. 2012).

Dados históricos até o 2008, revisados pela primeira vez por Ranson et al. (2010), depois atualizados por Vontas et al. (2012) e recentemente pelo Smith et al. (2016), compilam os níveis de resistência para as principais classes de inseticidas histórica e atualmente utilizados para o controle de *A. aegypti* e *A. albopictus* em todo o mundo, indicando para *A. aegypti* resistência a todos os inseticidas. Em contraste com o *A. aegypti*, em *A. albopictus* são conhecidos alguns relatos de resistência a inseticidas. Em relação a essas revisões, de 137 artigos avaliados, apenas 35 levaram em consideração o *A. albopictus*, nos quais a resistência aos OC, OP (Temephos) e PY foi registrada em alguns países da Ásia, África, Caribe e Europa. Na América do Sul, especialmente no Brasil, somente um estudo tem evidenciado perda de susceptibilidade ao OP Temephos em *A. albopictus* (Prophiro et al. 2011b). Globalmente, esta falta de informação em *A. albopictus* é, obviamente, relacionada ao seu papel menor como vetor de arbovírus em muitas partes do mundo, em comparação com *A. aegypti* (Smith et al. 2016). No entanto, a atenção para o controle do tigre asiático não deve ser negligenciada, mesmo quando ambas as espécies estão presentes, uma vez que *A. albopictus* é a principal conexão entre as áreas silvestres/rurais e suburbanas (Bonizzoni et al. 2013).

Na Colômbia os PY deltametrina e lambda-cialotrina e no Brasil os PY cipermetrina e deltametrina, têm sido utilizados desde 1990 e 1999, respectivamente, para controlar

Aedes spp (Braga & Valle 2007b; Maestre 2012). Resistência aos PY no Brasil e na Colômbia respectivamente, foram documentadas pela primeira vez em 2001 (nos estados de Alagoas, Sergipe e Rio de Janeiro) e 2006 (nos departamentos de Santander, Cundinamarca, Meta, Caqueta e Guaviare) (Da-Cunha et al. 2005; Santacoloma et al. 2010). Os estudos mais recentes em ambos os países indicam disseminação e distribuição de resistência aos PY na maioria dos estados/departamentos aonde o *A. aegypti* está presente (Bellinato et al. 2016; Chapadense et al. 2015; Fonseca-González et al. 2011; Maestre 2012; Ocampo et al. 2011). Portanto, na Colômbia e no Brasil, novas alternativas como a utilização de mosquitos transgênicos (conhecidos como RIDL- *Release of Insect Carrying a Dominant Lethal gene*) e/ou infectados com *Wolbachia* estão sendo avaliados para o controle desta espécie (Aliota et al. 2016; Carvalho et al. 2015; Dutra et al. 2015). No entanto, em ambos os países, *A. albopictus* não é considerado ainda alvo nos programas de controle vectorial, de forma que há poucos dados disponíveis referentes à resistência aos inseticidas (Prophiro et al. 2011b), com nenhuma pesquisa relacionada aos PY.

Em síntese, os RIDL são linhagens de machos de *A. aegypti* obtidas no laboratório que carregam um gene letal para a prole, visando à eliminação do vector de uma localidade, que ao copularem com fêmeas selvagens, a futura prole será inviável (Phuc et al. 2007). Por sua vez, a liberação de *A. aegypti* infectados com a bactéria endossimbiótica, *Wolbachia pipientis*–linhagem *WMel*, objetivam substituir a população local (via incompatibilidade citoplasmática) por uma população refrataria aos arbovírus transmitidas por esta espécie (McMeniman et al. 2009). Ambas as estratégias estão em fase de teste e apresentam boas perspectivas de sucesso. Porém, não se deve imaginar que uma única estratégia irá definitivamente eliminar o problema das arboviroses. A eliminação ou correto tratamento dos criadouros e o uso racional de inseticidas devem ainda perdurar como principais ferramentas por muito tempo.

A resistência metabólica e alterações no sítio-alvo representam as duas principais formas de resistência aos inseticidas (Hemingway et al. 2004). O papel de outros mecanismos, tais como a resistência cuticular é também provável (Wood et al. 2010). Todos estes mecanismos podem ocorrer simultaneamente nas populações resistentes com efeitos fenotípicos acumulativos, levando a resistência a um único ou vários inseticidas (Nkya et al. 2013). A resistência metabólica é conferida por alterações nos níveis ou atividades de enzimas de desintoxicação, predominantemente por

carboxilesterases (EST), oxidases de função mista (MFO), e/ou glutathione-S transferases (GST) (Montella et al. 2012). As alterações no sítio-alvo relacionam-se às mutações em genes que codificam proteínas para as moléculas-alvo dos inseticidas, como o canal de sódio voltagem-dependente (Na_v , alvo de PY e DDT), acetilcolinesterase (alvo de OP e CA) e/ou receptores GABA (alvo do OC dieldrin) (Hemingway et al. 2004).

Como diferentes classes podem compartilhar o mesmo alvo, a resistência a um composto pode resultar em resistência cruzada a outras classes. Por exemplo, apesar do DDT estar banido desde 1985 do Brasil (Braga & Valle 2007b) e de 1986 da Colômbia (Sánchez et al. 2006), o fato de compartilhar o alvo com os PY (Soderlund & Knipple 2003), faz com que alterações possivelmente selecionadas pelo uso de DDT no passado possam ter facilitado o rápido desenvolvimento de resistência aos PY (Dong et al. 2014).

Alterações estruturais no sítio-alvo de PY e DDT no Na_v diminuem a afinidade por esses inseticidas (Du et al. 2013; Du et al. 2015), de forma que estudos sugerem que mutações no Na_v apresentam papel relevante na resistência aos PY (Rinkevich et al. 2013; Rinkevich et al. 2015). O Na_v é uma proteína transmembranar presente nos axônios neuronais, composto por quatro domínios homólogos (I-IV), cada um com seis segmentos hidrofóbicos (Figura 2) (Catterall 2000). A resistência aos PY, conhecida como resistência *knockdown* (*kdr*), está associada com alterações no sítio-alvo do inseticida causada por mutações na sequência de nucleótidos do Na_v (Dong et al. 2014; Soderlund & Knipple 2003). A associação entre resistência *kdr* e alterações no sítio-alvo foram confirmadas analisando em conjunto estudos de expressão heteróloga, electrofisiológicos e de mapeamento genético (Smith et al. 2016). Até agora, vários artrópodes pragas na agricultura e pecuária, assim como insetos vetores de agentes etiológicos de doenças, são resistentes à PY e DDT, mostrando alterações no Na_v (Rinkevich et al. 2013).

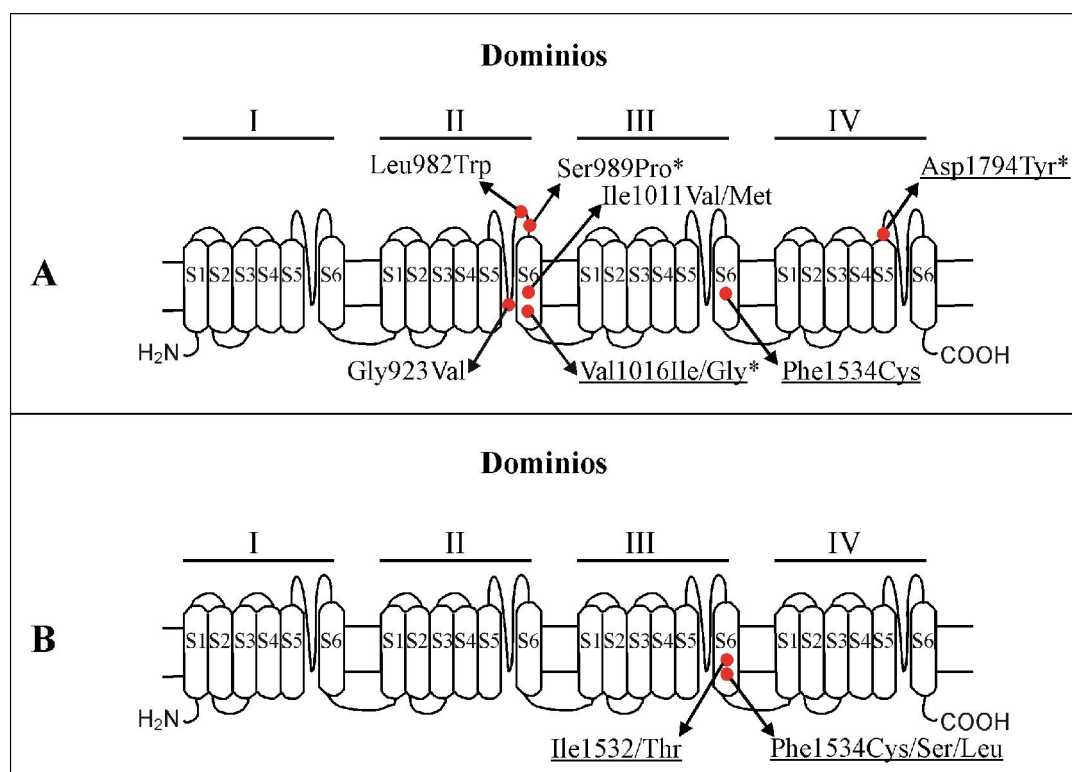


Figura 2. O canal de sódio voltagem-dependente, seus domínios (I-IV) e segmentos (S1-S6), com destaque nas mutações *kdr* identificadas em *Aedes aegypti* (A) e *Aedes albopictus* (B). * Mutações *kdr* exclusivas em *Aedes aegypti*; As mutações sublinhadas são aquelas vinculadas com resistência. Figura adaptada de Rinkevich et al. (2013).

Em insetos, várias mutações pontuais têm sido relatadas por conferir o fenótipo *kdr*, a maioria delas entre os segmentos IIS6 e IIIS6 no Nav. Em *A. aegypti*, 12 mutações não-sinônimas em nove diferentes códons têm sido relatadas (Figura 2a) (Bregues et al. 2003; Chang et al. 2009; Harris et al. 2010; Kushwah et al. 2015b; Saavedra-Rodriguez et al. 2007). Nesta espécie, as mutações *kdr*: Val1016Ile na América, Val1016Gly na Ásia (segmento IIS6) e Phe1534Cys (segmento IIIS6) em ambos os continentes, América e Ásia, tem sido claramente vinculadas com resistência aos PY (Harris et al. 2010; Kawada et al. 2009a; Linss et al. 2014; Saavedra-Rodriguez et al. 2007). Mutações adicionais no segmento IIS6 do Nav e também em *A. aegypti*, como Leu982Trp, Ser989Pro, Ile1011Met e Ile1011Val, foram associadas em menor medida com resistência aos PY (Bregues et al. 2003; Kawada et al. 2014). Em contraste, a presença de mutações *kdr* em *A. albopictus* têm sido pouco estudadas. Em *A. albopictus*, apenas quatro alterações nas posições 1532 e 1534, ambas no segmento IIIS6, foram registradas (Figura 2b). A mutação Phe1534Cys, similar a mutação mais

frequente em *A. aegypti*, foi registrada na Singapura (Kasai et al. 2011), China (Chen et al. 2016) e Grécia (Xu et al. 2016); 1534Leu na USA (Marcombe et al. 2014) e China (Chen et al. 2016; Xu et al. 2016); e 1534Ser também na USA e China (Xu et al. 2016). A substituição no sítio 1532 (Ile1532Thr) apareceu apenas em populações de *A. albopictus* da Itália (Xu et al. 2016). No entanto, em populações resistentes ao DDT e PY de *A. albopictus* da Índia e Malásia não foi observada a presença de mutações *kdr* (Ishak et al. 2015a; Kushwah et al. 2015a).

Relatórios de campo e de laboratório revelam uma rápida disseminação da resistência aos PY e um aumento drástico nas taxas da mutação Val1016Ile em populações de *A. aegypti* das Américas do Norte e do Sul (García et al. 2009; Marcombe et al. 2012; Martins et al. 2009b; Saavedra-Rodriguez et al. 2007). No entanto, recentemente em populações de *A. aegypti* das Américas do Norte (México) e do Sul (Brasil e Guiana Francesa), assim como do Caribe (Guadalupe), tem se observado que a resistência aos PY dessas populações estaria relacionada à seleção múltipla de duas mutações *kdr*: Val1016Ile e Phe1534Cys (Dusfour et al. 2015; Linss et al. 2014; Vera-Maloof et al. 2015). Nessas populações, três alelos *kdr* foram observados: R1 (1016Val⁺ + 1534Cys^{*kdr*}), R2 (1016Ile^{*kdr*} + 1534Cys^{*kdr*}) e R3 (1016Ile^{*kdr*} + 1534Phe⁺) (Dusfour et al. 2015; Linss et al. 2014; Vera-Maloof et al. 2015), sendo que no Brasil não há registro do alelo R3, e na Colômbia não há trabalhos nesse sentido.

Múltiplas combinações de mutações podem conferir maiores níveis de resistência em mosquitos, como observado nos vetores primários da malária na Ásia e África: *Anopheles culicifacies* (Val1010Leu + Leu1014Ser) e *Anopheles gambiae* (Leu1014Phe + Asn1575Tyr) (Jones et al. 2012; Singh et al. 2010). Em populações de *A. aegypti* da Ásia as combinações de mutações *kdr*: Ser989Pro + Val1016Gly, Val1016Gly + Phe1534Cys e Ser989Pro + Val1016Gly + Phe1534Cys tem sido observadas (Kawada et al. 2014; Pang et al. 2015).

Neste trabalho, foi investigada a ocorrência, frequência e distribuição de eventuais mutações *kdr* nos segmentos IIS6 e IIS6 do Nav de populações naturais de *A. aegypti* da Colômbia e Brasil, e de *A. albopictus* do Brasil.

2. JUSTIFICATIVA

Embora vários estudos estejam sendo realizados para desenvolver uma vacina eficiente para o controle de dengue, chikungunya e Zika (Schwartz et al. 2015), o uso de inseticidas neurotóxicos continua sendo um método essencial nos programas de controle vetorial para diminuir o tamanho populacional de *A. aegypti* e *A. albopictus* (Grard et al. 2014; Vazeille et al. 2011; Weaver 2014; WHOPEs 2013; Yakob & Walker 2016), ambas as espécies amplamente disseminadas e distribuídas tanto na Colômbia quanto no Brasil (Carvalho et al. 2014; Rúa-Urbe et al. 2012).

Nestes países, os programas de controle vetorial estão focados na eliminação dos criadouros das formas imaturas de *Aedes* spp. e na participação da comunidade. No entanto, em casos de epidemias, é recomendada a utilização de inseticidas, como os PY para o controle das formas adultas (WHO 2013). Contudo, globalmente, o uso excessivo destes inseticidas por parte dos programas de controle vetorial e dos cidadãos tem selecionado populações de *Aedes* spp. resistentes aos PY (Smith et al. 2016; Vontas et al. 2012).

As opções de substituição para outras classes de inseticidas são escassas devido à pouca oferta de produtos com alvos distintos e que sejam seguros ao meio ambiente e aos elevados custos de desenvolvimento. A resistência aos inseticidas é um problema biológico, mas também técnico, que se deve conhecer em profundidade para determinar o impacto nos programas de controle vetorial (IRAC 2011). Dessa forma, conhecer a ocorrência, frequência e distribuição de mutações *kdr* presentes nos segmentos IIS6 e IIIS6 do Na_v nas duas principais espécies vetores de arbovirose na Colômbia e no Brasil é a proposta central deste trabalho de investigação.

Os resultados aqui obtidos sobre a diversidade molecular do Na_v em populações naturais de *A. aegypti* da Colômbia e Brasil contribuem ao conhecimento dos alelos atualmente envolvidos com a resistência aos PY, assim como sua distribuição em algumas populações de ambos os países. Esses resultados podem auxiliar aos programas de controle vetorial de ambos os países, especialmente a Colômbia, por ela ter pouco conhecimento nesta área de pesquisa, no sentido da incorporação das metodologias aqui utilizadas para monitorar as frequências genotípicas e alélicas das mutações *kdr*. Já em *A. albopictus*, nossos resultados indicam que essa espécie deve ser alvo dos programas

de controle vetorial da América do Sul, já que a detecção de mutações *kdr* nesta espécie coloca em risco o uso contínuo de PY para seu controle.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

- ✓ Investigar a ocorrência, frequência e distribuição de mutações *kdr* presentes nos segmentos IIS6 e IIIS6 do Nav em populações naturais de *A. aegypti* da Colômbia e Brasil e *A. albopictus* do Brasil.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Amplificar, clonar e sequenciar os segmentos IIS6 e IIIS6 do Nav de *A. aegypti* e *A. albopictus*;
- ✓ Verificar alterações na frequência dos alelos *kdr* em populações naturais de *A. aegypti* da Colômbia e Brasil;
- ✓ Analisar a distribuição espacial dos alelos *kdr* na área urbana de Foz do Iguaçu (Paraná, Brasil), localizada na área da fronteira com Paraguai e Argentina;
- ✓ Examinar a frequência da mutação Phe1534Cys em populações naturais de *A. albopictus* do Brasil.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Amostragem das populações de *A. aegypti*.

As populações da Colômbia foram coletadas em três municípios do Departamento do Quindío: Armênia, Montenegro, Calarcá e Barcelona, um distrito de Calarcá, região Andina. Estas populações foram coletadas pelo autor deste documento, seguindo a metodologia da Organização Pan-americana da Saúde (OPS) para determinar os índices de infestação de *A. aegypti* (OPS 1995). As populações brasileiras de *A. aegypti* foram coletadas nos municípios de Cacoal, Guajará-Mirim, Jarú, Porto Velho (Estado de Rondônia), Sinop, Varzea Grande, Rondonópolis (Estado de Mato Grosso) e Foz do Iguaçu (Estado de Paraná), seguindo as instruções da Rede Nacional de Monitoramento da Resistência de *A. aegypti* (MoReNAa) (Montella et al. 2007). Adicionalmente, adultos de *A. aegypti* foram coletados em Governador Valadares (Estado de Minas Gerais) pelo professor Doutor Gabriel Augusto Rodrigues de Melo (UFPR/PR). Geopoliticamente, os Estados de Rondônia, Mato Grosso, Minas Gerais e Paraná são parte das regiões Norte, Centro-Oeste, Sudeste e Sul, respectivamente. A localização geográfica e o ano de coleta são apresentados na Figura 3. Todas as amostras foram coletadas pelos agentes de saúde pública dos programas de controle vetorial de cada município. Em todos os casos, foram utilizadas ovitrampas na área peridoméstica, separadas entre elas por 100 m (Fay & Eliason 1966).

Em Foz de Iguaçu, a amostragem seguiu o método de Levantamento Rápido do Índice de Infestação de *A. aegypti* (LIRAA), onde cada estrato deve corresponder às regiões geográficas com um número equivalente de imóveis. Neste caso, cada estrato tendo um mínimo de 8.100 imóveis e um máximo de 12.000 edificações (Ministerio-da-Saúde 2013). A divisão em estratos foi usada a fim de verificar a presença de distribuição dos alelos *kdr* na área urbana (Figura 4). Foz do Iguaçu é uma cidade de porte grande, possuindo mais de 8.100 imóveis, e faz fronteira com *Puerto Iguazú*, na Argentina, e *Ciudad del Este*, no Paraguai (IBGE 2013).

As amostras recolhidas da Colômbia e Brasil foram encaminhadas ao Laboratório de Entomologia Médica e Veterinária (LEMV) da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Os ovos de *Aedes* spp. coletados foram induzidos à eclosão em laboratório e mantidos até a emergência dos adultos sob condições controladas ($25^{\circ}\text{C} \pm 1$, umidade $80\% \pm 10$ e fotoperíodo 12:12 horas). Adultos recém-emergidos de *A.*

aegypti correspondentes a cada população foram coletados para as análises moleculares. Todos os mosquitos foram individualmente acondicionados em etanol absoluto (99.5%) e armazenados a -20°C.

4.2. Amplificação, clonagem e sequenciamento dos segmentos IIS6 e IIIS6 do *Na_v* em *A. aegypti*.

As extrações de DNA seguiram a metodologia descrita por Aguirre-Obando *et al.* (2015). Todas as amostras de cada localidade foram extraídas individualmente. O volume de 1 µL [20 ng/µL] de cada extração foi adicionada para formar um *pool* de DNA para cada uma das 13 localidades. Esses *pools* de DNA foram usados para amplificar a região genômica correspondente aos segmentos IIS6 e IIIS6 do *Na_v*. A fim de amplificar essas regiões por PCR, os *primers* utilizados foram: 5para3- 5'ACAATGTGGATCGCTTCCC3' e 3para3- 5'TGGACAAAAGCAAGGCTAAG3' (Martins *et al.* 2009a) e AaEx31P-5'TCGCGGGAGGTAAGTTATTG3' e AaEx31Q-5'GTTGATGTGCGATGGAAATG3' (Harris *et al.* 2010), respectivamente para os segmentos IIS6 e IIIS6 do *Na_v*.

As reações PCR foram realizadas utilizando o kit da USB® FidelityTaq™ DNA polimerase (Affymetrix; 0.03 U Taq DNA polimerase e 1X buffer) contendo 20 ng/µL do *pool* de DNA genômico, 1 µM de cada *primer* e 0.25 µM de dNTP em 50 µL de reação. As condições PCR para ambos os segmentos, IIS6 e IIIS6 do *Na_v* foram: 94°C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto, com uma extensão final de 72°C por 3 minutos. Os produtos PCR foram purificados utilizando-se a abordagem dos *beads* magnéticos (Agencourt® AMPure® XP, Beckman Coulter, Inc.), a partir da qual foram aplicados 2 µL para levar a cabo a reação de ligação utilizando-se o kit de clonagem CloneJet (Thermo Scientific), ambos seguindo as instruções do fabricante. O volume de 3 µL de cada reação de ligação foi usado para transformar células competentes de *Escherichia coli* DH5α. Cerca de 200 colônias escolhidas aleatoriamente foram inoculadas em 1 mL de meio de cultura CircleGrow (MP Biomedicals) com 1 mg/L de ampicilina, em placas de fundo profundo (do inglês: *deep well plates*), e, em seguida, incubadas durante 22 h a 37°C e 220 rpm. As mini-preparações de DNA seguiram o procedimento de lises alcalina (Sambrook & Russell 2001). As reações de sequenciamento foram realizadas com o kit Big Dye 3.1 (LifeTechnologies/Applied Biosystems), seguindo as instruções do fabricante, e sequenciados num sequenciador automático ABI377

(LifeTechnologies/Applied Biosystems) na plataforma de sequenciamento de DNA da FIOCRUZ (Plataforma de Sequenciamento/PDTIS/Fiocruz).

As análises das sequências foram realizadas utilizando o programa Geneious® (R7.1.3. Biomatters, Auckland, New Zealand) e a plataforma do NCBI. Apenas as alterações nas sequências de pelo menos dois clones independentes foram consideradas, já que alguns dos *singletons* podem representar mutações induzidas por PCR (Martins et al. 2009a). Os haplótipos encontrados neste estudo foram depositadas no GenBank [GenBank: XXX - XXX]. O programa Mega 6.1 foi utilizado para traduzir os segmentos IIS6 e IIS6 do *Nav* em sequências de aminoácidos para verificar a ocorrência de mutações não sinônimas (Tamura et al. 2013). A numeração dos códons foi determinada de acordo com a numeração previamente descrita no *Nav* de *Musca domestica*.

Adicionalmente, usando-se o intron entre os exon 20 e 21 das sequencias dos haplótipos referentes ao segmento IIS6 do *Nav* encontrados neste estudo, juntamente com as sequências disponíveis no trabalho do Kawada et al. (2016) (Tabela 2), foi realizada uma análises filogenética para determinar a afinidade genética das populações de *A. aegypti* da Colômbia e Brasil com outras populações. Nesta análise, foram considerados todos os *indels*. O alinhamento resultante foi analisado através do programa jModelTest com o critério de informação Akaike (AIC) para determinar o modelo de evolução nucleotídica mais adequado (Darriba et al. 2012). A árvore filogenética resultante, após a seleção do modelo evolutivo, foi construída usando o programa Mega 6.1. (Tamura et al. 2013).

Tabela 2. Informação das sequências entre os exón 20 e 21 para o segmento IIS6 do *Na_v* de *Aedes aegypti* utilizadas para a análise filogenética. Fonte: Kawada et al. (2016).

Pais (código)	Região	Numero do acesso no GenBank
Brasil (FJ479609)	América do Sul	FJ479609
Brasil (FJ479610)	América do Sul	FJ479610
Brasil (FJ479611)	América do Sul	FJ479611
Brasil (FJ479613)	América do Sul	FJ479613
Brasil (JX275501)	América do Sul	JX275501
El Salvador (LC036550)	América Central	LC036550
Guatemala (LC050222)	América Central	LC050222
Gana (LC036551)	África Ocidental	LC036551
Gana (LC036552)	África Ocidental	LC036552
Quênia (LC085630)	África Oriental	LC085630
Quênia (LC085631)	África Oriental	LC085631
Quênia (LC085632)	África Oriental	LC085632
Quênia (LC085633)	África Oriental	LC085633
Quênia (LC085634)	África Oriental	LC085634
Quênia (LC085635)	África Oriental	LC085635
Quênia (LC085636)	África Oriental	LC085636
Quênia (LC085637)	África Oriental	LC085637
Malavi (LC050219)	África do Sul	LC050219
Malavi (LC050220)	África do Sul	LC050220
Malavi (LC050221)	África do Sul	LC050221
Zâmbia (LC085638)	África do Sul	LC085638
Zâmbia (LC085639)	África do Sul	LC085639
Zâmbia (LC085640)	África do Sul	LC085640
Zâmbia (LC085641)	África do Sul	LC085641
Zimbábue (LC085642)	África do Sul	LC085642
Zimbábue (LC085643)	África do Sul	LC085643
Índia (KM677321)	Sul da Ásia	KM677321
Índia (KM677334)	Sul da Ásia	KM677334
Indonésia (KJ957878)	Sudeste Asiático	KJ957878
Indonésia (KJ957879)	Sudeste Asiático	KJ957879
Indonésia (KJ957881)	Sudeste Asiático	KJ957881
Indonésia (KJ957883)	Sudeste Asiático	KJ957883
Myanmar (AB914689)	Sudeste Asiático	AB914689
Myanmar (AB914690)	Sudeste Asiático	AB914690
Filipinas (LC060441)	Sudeste Asiático	LC060441
Filipinas (LC060442)	Sudeste Asiático	LC060442
Filipinas (LC060443)	Sudeste Asiático	LC060443
Filipinas (LC060444)	Sudeste Asiático	LC060444
Filipinas (LC060445)	Sudeste Asiático	LC060445
Filipinas (LC060446)	Sudeste Asiático	LC060446
Filipinas (LC060447)	Sudeste Asiático	LC060447
Cingapura (LC036553)	Sudeste Asiático	LC036553
Vietnã (LC036554)	Sudeste Asiático	LC036554
Vietnã (LC036555)	Sudeste Asiático	LC036555
Vietnã (LC036556)	Sudeste Asiático	LC036556
Vietnã (LC036557)	Sudeste Asiático	LC036557
Vietnã (LC036558)	Sudeste Asiático	LC036558
Vietnã (LC036559)	Sudeste Asiático	LC036559

4.3. Genotipagem dos sítios 1016 e 1534 em *A. aegypti*.

Foram genotipadas todas as amostras de cada localidade com base na mesma PCR alelo específica (AS-PCR) previamente concebida para as variações Val1016Ile e Phe1534Cys em *A. aegypti* (Harris et al. 2010; Martins et al. 2009b). Resumidamente, a discriminação dos produtos de PCR foi possível devido a uma cauda GC ligada à extremidade 5' dos *primers*, se diferenciando entre eles por 20 nucleotídeos. Além disso, um aumento da especificidade da reação foi obtido por uma transversão no antepenúltimo nucleotídeo 3' de cada *primer* alelo específico (Okimoto & Dodgson 1996; Saavedra-Rodriguez et al. 2007; Wang et al. 2005). Cerca de 40 amostras de cada população foram genotipadas individualmente seguindo o protocolo descrito por Linns *et al.* (2014). Todos os lotes de reações incluíram controles positivos para os genótipos nos sítios 1016 (Val⁺/Val⁺, Val⁺/Ile^{kdr} e Ile^{kdr}/Ile^{kdr}) e 1534 (Phe⁺/Phe⁺, Phe⁺/Cys^{kdr} e Cys^{kdr}/Cys^{kdr}), tomados a partir das linhagens de *A. aegypti*, respectivamente Rockefeller (Rock), Rock-*kdr* e uma mistura delas em concentrações equimolares. A linhagem *A. aegypti* Rockefeller é padrão para testar a susceptibilidade aos inseticidas (Kuno 2010), enquanto que a Rock-*kdr* é um linhagem resistente aos PY, previamente selecionada em laboratório para ambas as mutações 1016Ile^{kdr} e 1534Cys^{kdr} (alelo R2) [mais detalhes ver: Brito et al. (2013)].

Os amplificações AS-PCR foram verificados em eletroforeses em gel de poli(acrilamida a 10% corado num banho de solução Safer (Kasvi: 6X). Para cada localidade da Colômbia e do Brasil, as frequências genotípicas e alélicas, bem como a hipóteses de equilíbrio de Hardy-Weinberg (HW) foram calculadas utilizando os resultados dos géis (Hartl & Clark 2010). Para Foz do Iguaçu, as frequências genotípicas e alélicas, assim como o teste para HW foram analisadas considerando-se i) cada estrato individualmente e ii) a cidade como um todo. Em todos os casos, os sítios 1016 e 1534 foram considerados sítios ligados; portanto, as frequências genotípicas e alélicas foram tomadas como um único locus. Assim, para cada indivíduo, haveria evidência de seis genótipos e três alelos (Linns et al. 2014). Os seis genótipos são SS (Val⁺/Val⁺ + Phe⁺/Phe⁺), SR1 (Val⁺/Val⁺ + Phe⁺/Cys^{kdr}), SR2 (Val⁺/Ile^{kdr} + Phe⁺/Cys^{kdr}), R1R1 (Val⁺/Val⁺ + Cys^{kdr}/Cys^{kdr}), R1R2 (Val⁺/Ile^{kdr} + Cys^{kdr}/Cys^{kdr}) e R2R2 (Ile^{kdr}/Ile^{kdr} + Cys^{kdr}/Cys^{kdr}), sendo os três alelos: o tipo selvagem susceptível (Na_V^S = 1016 Val⁺ + 1534 Phe⁺), substituições restritas para o sítio 1534 (Na_V^{R1} = 1016 Val⁺ + 1534 Cys^{kdr}) ou substituições simultâneas em ambos os sítios 1016 e 1534 (Na_V^{R2} = 1016 Ile^{kdr} +

1534 Cys^{*kdr*}) O fenótipo *kdr* é uma característica recessiva, ou seja é necessário que o indivíduo seja homozigoto para a mutação *kdr* ser resistente aos PY (Dong et al. 2014). Além disso, dados ainda não publicados de nosso grupo mostraram que heterozigotos entre os alelos Nav^{R1} e Nav^{R2} (R1R2) são também resistentes. Desta forma, a partir da análise das AS-PCR para os sítios 1016 e 1534, consideramos os genótipos SS, SR1 e SR2 (para susceptibilidade) e R1R1, R2R2 e R1R2 (para resistência aos PY).

4.4. Amostragem das populações de *A. albopictus*.

A coleção de ovos de *Aedes* spp. dos municípios de Cianorte, Foz do Iguaçu, Maringá, Marilena, Nova Londrina, Alvorada do Sul (Estado do Paraná), Rondonópolis (Estado de Mato Grosso) e Porto Velho (Estado de Rondônia) seguiu à metodologia descrita pela Rede MoReNAa (Montella et al. 2007). Geopoliticamente, os Estados de Paraná, Mato Grosso e Rondônia são parte das regiões Sul, Centro-Oeste e Norte, respectivamente. A localização geográfica assim e o ano de coleta das populações são apresentados na Figura 8. Todas as amostras foram coletadas pelos agentes de saúde pública dos programas de controle vetorial de cada município. Em todos os casos, foram utilizadas ovitrampas na área peridoméstica, separadas entre elas por 100 m (Fay& Eliason 1966). As amostras recolhidas foram encaminhadas ao LEMV na UFPR. Os ovos de *Aedes* spp. coletados foram induzidos à eclosão no laboratório, e mantidos até a emergência dos adultos sob condições controladas ($25^{\circ}\text{C} \pm 1$, umidade $80\% \pm 10$ e fotoperíodo 12:12 horas). Adultos recém-emergidos de *A. albopictus* de cada população foram coletados para as análises moleculares. Todos os mosquitos foram individualmente acondicionados em etanol absoluto (99.5%) e armazenados à -20°C .

4.4. Amplificação, clonagem e sequenciamento dos segmentos IIS6 e IIIS6 do *Na_v* em *A. albopictus*.

As extrações de DNA seguiram a metodologia descrita por Aguirre-Obando *et al.* (2015). Todas as amostras de cada localidade foram extraídas individualmente. O volume de 1 μL [20 ng/ μL] de cada extração foi adicionado para formar um *pool* de DNA para cada um dos três estados (Paraná, Mato Grosso e Rondônia). Esses *pools* de DNA foram usados para amplificar a região genômica correspondente aos segmentos IIS6 e IIIS6 do *Na_v*, como proposto por outros autores (Harris et al. 2010; Martins et al. 2009a). Foram utilizados os *primers* previamente desenvolvidos para *A. aegypti*: 5para3- 5'ACAATGTGGATCGCTTCCC3' e 3para3- 5'TGGACAAAAGCAAGGCTAAG3' (Martins et al. 2009a) e AaEx31P-5'TCGCGGGAGGTAAGTTATTG3' e AaEx31Q- 5'GTTGATGTGCGATGGAAATG3' (Harris et al. 2010), respectivamente para os segmentos IIS6 e IIIS6 do *Na_v*.

As reações PCR foram realizadas utilizando o kit da USB® Fidelity™ DNA polimerase (Affymetrix; 0.03 U Taq DNA polimerase e 1X buffer) contendo 20 ng/ μL do *pool* de DNA genômico, 1 μM de cada *primer* e 0.25 μM de dNTP em 40 μL de reação. As condições PCR para ambos os segmentos, IIS6 e IIS6 do *Na_v* foram: 95°C

por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 60°C por 40 segundos e 72°C por 1 minuto, com uma extensão final de 72°C por 5 minutos. Os produtos PCR foram purificados utilizando-se a abordagem dos *beads* magnéticos (Agencourt® AMPure® XP, Beckman Coulter, Inc.), a partir da qual foram aplicados 2 µL para levar a cabo a reação de ligação utilizando-se o kit de clonagem CloneJet (Thermo Scientific), ambos seguindo as instruções do fabricante. O volume de 3 µL de cada reação de ligação foi usado para transformar células competentes de *Escherichia coli* DH5α. Cerca de 200 colônias escolhidas aleatoriamente foram inoculadas em 1 mL de meio de cultura CircleGrow (MP Biomedicals) com 1 mg/L de ampicilina, em placas de fundo profundo (do inglês: *deep well plates*), e, em seguida, incubadas durante 22 h a 37°C e 220 rpm. As mini-preparações de DNA seguiram o procedimento de lises alcalina (Sambrook & Russell 2001). As reações de sequenciamento foram realizadas com o kit Big Dye 3.1 (LifeTechnologies/Applied Biosystems), seguindo as instruções do fabricante, e sequenciados num sequenciador automático ABI377 (LifeTechnologies/Applied Biosystems), na plataforma de sequenciamento de DNA da FIOCRUZ (Plataforma de Sequenciamento/PDTIS/Fiocruz).

As análises das sequências foram realizadas utilizando o programa Geneious® (R7.1.3. Biomatters, Auckland, New Zealand) e a plataforma do NCBI. Apenas as alterações nas sequências de pelo menos dois clones independentes foram consideradas, já que alguns dos *singletons* podem representar mutações induzidas por PCR (Martins et al. 2009a). Os haplótipos encontrados neste estudo foram depositadas no GenBank [GenBank: KX281169 - KX281170 e KX371864 - KX371865]. O programa Mega 6.1 foi utilizado para traduzir os segmentos IIS6 e IIIS6 do *Na_v* em sequências de aminoácidos para verificar a ocorrência de mutações não sinónimas (Tamura et al. 2013). A numeração dos códons foi determinada de acordo com a numeração previamente descrita no *Na_v* de *Musca domestica*.

4.5. Genotipagem do sítio 1534 em *A. albopictus*.

Devido à alta conservação entre *A. aegypti* e *A. albopictus* no segmento IIIS6 do *Na_v*, foi utilizada a mesma técnica AS-PCR previamente concebida para a variação Phe1534Cys em *A. aegypti* (Harris et al. 2010). Cerca de 15 amostras de cada população foram genotipadas individualmente seguindo o protocolo descrito por Linns *et al.* (2014). Todos os lotes de reações incluíram controles positivos para os genótipos 1534 Phe/Phe, Cys/Cys e Phe/Cys, tomados a partir das linhagens de *A. aegypti*,

respectivamente Rockefeller (Rock), Rock-*kdr* e uma mistura delas em concentrações equimolares. A linhagem *A. aegypti* Rockefeller é padrão para testar a susceptibilidade aos inseticidas (Kuno 2010), enquanto que, a Rock-*kdr* é uma linhagem resistente aos PY, previamente selecionada em laboratório para ambas as mutações 1016Ile^{*kdr*} e 1534Cys^{*kdr*} (alelo R2) [mais detalhes ver: Brito et al. (2013)]. Os amplicões AS-PCR foram verificados em eletroforeses em gel de poliacrilamida a 10% corado num banho de solução Safer (Kasvi: 6X). Ao analisar os produtos de amplificação, as frequências alélicas e genotípicas, bem como o teste de HW foram calculados (Hartl & Clark 2010). Estas análises foram feitas de duas maneiras: primeiro, cada município foi considerado e analisado individualmente; e, segundo, os municípios do Estado de Paraná, foram reunidos e analisados em conjunto.

5. RESULTADOS

5.1. Populações de *A. aegypti*.

A distribuição de espécimes resultantes para cada espécie está apresentada na Tabela 3, juntamente a dados físicos, demográficos e de casos de dengue para cada localidade aqui estudada. Em todas as localidades amostradas de ambos os países houve predomínio de *A. aegypti* e em apenas três municípios do Brasil também foram coletados espécimes de *A. albopictus*.

Com relação à diversidade nucleotídica do segmento IIS6 do *Na_v* de *A. aegypti*, foram obtidas ao todo 138 sequências resultando em 15 haplótipos (H), sete exclusivos da Colômbia (H3, H4, H7, H8, H9, H11 e H12) e os outros oito do Brasil (H1, H2, H5, H6, H10, H13, H14 e H15) (Tabelas 4 e 5). Os haplótipos mais frequentes foram H1 (21.7%) e H2 (21.0%) no Brasil e H3 (10.9%) e H4 (10.9%) na Colômbia, presentes em todas as populações de seus países respectivos (Tabela 4).

Os haplótipos H5 (Brasil), H9, H11 e H12 (Colômbia) apresentaram a substituição não sinônima Ile1011Met e os haplótipos H1, H9 (Colômbia), H14 e H15 (Brasil) apresentaram a mutação *kdr* Val1016Ile. Vale ressaltar que nenhum destes apresentou as duas mutações na mesma sequência (Figura 5). Em todas as populações de mosquitos da Colômbia e do Brasil foram observadas as mutações Ile1011Met e Val1016Ile, com exceção de Barcelona, Colômbia, que não apresentou a mutação *kdr* Val1016Ile (Figura 5).

Os resultados do programa jModelTest sugerem que o melhor modelo de evolução nucleotídica para nossos dados é o modelo Hasegawa-Kishino-Yano + Gamma Distributed (HKY+G) (Tabela 6). A partir desse modelo, foi realizada uma análise filogenética entre os haplótipos aqui observados e sequências homólogas de populações de *A. aegypti* de diferentes localidades do mundo, recentemente publicadas (Kawada et al. 2016). A análise sugeriu dois grandes clados (Figura 6), o clado 1 contendo a maioria das sequências da África, Ásia e algumas de América do Sul; o clado 2, contendo a maioria das sequências das Américas, mas também da Ásia e da África.

A determinação destes clados está definida principalmente por um vasto polimorfismo no íntron, que previamente havia classificado as sequências IIS6 do *Na_v*

de *A. aegypti* como pertencentes ao grupo A (aqui clado 2) ou grupo B (aqui clado 1) (Martins et al. 2009a). Portanto, em todos os continentes representados há presença de sequências de ambos os tipos A e B, sugerindo que se trata de um polimorfismo antigo e disseminado desde a expansão do *A. aegypti* da África para os outros continentes. Os haplótipos H3, H4 e H8 estão relacionados ao clado 1, tendo um relacionamento mais forte com as sequências asiáticas daquele clado. Os demais haplótipos estão relacionados ao clado 2. No entanto, no clado 2, dentro do qual, os haplótipos colombianos H7, H9, H11 e H12, formaram um grupo monofilético (Figura 6).

O segmento IIIS6 do Na_V de *A. aegypti* rendeu sequências de 153 clones, com baixa variabilidade nucleotídica. Apenas uma substituição não-sinônima foi observada, justamente a equivalente ao Polimorfismo de Nucleotídeo Único (SNP): TTC/TGC, correspondente à mutação *kdr* Phe1534Cys (H16 e H17) (Figura 7). O haplótipo 1534Cys^{*kdr*} (H17) estava presente em todas as populações de *A. aegypti* da Colômbia e do Brasil (Tabela 4). A Figura 7 apresenta um alinhamento dos haplótipos encontrados neste estudo referente ao segmento IIIS6, assim como de outros países, os quais evidenciam uma alta similaridade.

Determinada a diversidade nucleotídica e constatada a presença das mutações *kdr* Val1016Ile e Phe1534Cys, indivíduos de *A. aegypti* de cada população foram genotipados via AS-PCR para ambos os sítios, a fim de se determinar as frequências genotípica e alélica, considerando estes sítios ligados em um locus único.

A Figura 8 apresenta a fotografia de um exemplo de gel de eletroforese em poliacrilamida, contendo os produtos de reações de AS-PCR para ambos os sítios 1016 e 1534. Com base nestas análises, foram observados os alelos Na_V^S (1016Val⁺ + 1534Phe⁺), Na_V^{R1} (1016Val⁺ + 1534Cys^{*kdr*}) e Na_V^{R2} (1016Ile^{*kdr*} + 1534Cys^{*kdr*}) em todas as populações de *A. aegypti* da Colômbia e Brasil (Figura 3).

O alelo Na_V^S foi o menos frequente nas populações da Colômbia, sendo o *kdr* Na_V^{R1} geralmente mais frequente que o Na_V^{R2} , exceto em Barcelona, onde os alelos *kdr* tiveram a mesma frequência (44%) (Figura 3a). A Tabela 7 apresenta as frequências genotípicas, evidenciando que a taxa de indivíduos com algum genótipo para resistência (somatório de R1R1, R1R2 e R2R2) variou entre 65 (Montenegro) e 88% (Calarcá).

Em relação às amostras do Brasil, o alelo Nav^S só esteve em maior frequência que os dois alelos *kdr* somados em Jaru, Estado de Rondônia. Ou seja, no geral os alelos *kdr* estavam em maioria, disseminados por todas as localidades (Figura 3b). O somatório dos genótipos para resistência variou entre 27 (Jaru, Rondônia) e 100% (Governador Valadares, Minas Gerais) (Tabela 7). Em Foz do Iguaçu, excetuando-se o extrato 1 do qual se obteve poucas amostras, o alelo *kdr* Nav^{R2} foi predominante em todos os estratos, variando entre 55 (estrato 9) e 80% (estrato 6) (Figura 4). É interessante notar que os estratos que apresentaram genótipos para resistência somando acima de 90% estão justamente na fronteira com Ciudad del Leste, Paraguai (estratos 6 e 10) e Puerto Iguazú, Argentina (estrato 10).

As altas frequências dos alelos *kdr* para populações colombianas e brasileiras de *A. aegypti* aqui observadas sugerem alta propensão à resistência a PY, pelo menos no que se refere ao mecanismo de resistência do sítio alvo.

Tabela 3. Dados demográficos, número de casos de dengue e numero de *Aedes aegypti*/*Aedes albopictus* obtidos das localidades amostradas. Os dados referentes para Barcelona na Colômbia estão inclusos dentro das populações de Calarcá, por ele ser parte desta municipalidade.

País	Estado	Municipalidade	Informação demográfica		Número de casos de dengue registrados anualmente								Amostragem***		
			Habitantes	Área (Km ²)	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	Ano de amostragem	<i>A. aegypti</i>	<i>A. albopictus</i>
Colômbia*	Quindío	Armênia	288.908	650,00	107,2	112,4	1822,4	400	700	800	400	700	2011	739	---
		Calarcá	75.628	219,23	180,1	335,4	2254,2	141	190	321	184	134	2011	628	---
		Montenegro	40.590	148,92	559,7	179,6	3170,7	200	350	---	6	51	2011	531	---
Brasil**	Rondônia	Porto Velho	428.527	34.090,90	2.461	2.740	6.096	132	132	663	969	156	2009	9.203	162
		Cacoal	78.574	3.792,95	780	1.583	835	34	18	686	17	73	2010	2.185	---
		Guajará-Mirim	41.656	24.855,72	878	1.197	1.112	462	373	267	0	17	2010	2.913	---
		Jaru	52.005	2.944,13	60	2.556	681	34	106	278	3	3	2011	570	---
	Mato Grosso	Rondonópolis	195.476 ^b	4.159,10	718	2.524	2.728	344	1.568	3.271	652	1.960	2011	1.383	2
		Sinop	113.099	3.942,23	206	3.858	2.365	756	4.120	8.429	2.929	3.628	2011	672	---
		Varzea Grande	252.596	1.048,21	189	3.945	1.441	165	2761	779	485	2.167	2011	535	---
	Minas Gerais	Governador Valadares	263.689	2.342,32	726	1.709	1.313	1.838	2.559	1.183	937	901	2012	26	---
	Paraná	Foz do Iguaçu	256.088	618,40	1.360	531	10.393	1.226	214	688	137	811	2011	378	6

*Os dados demográficos da Colômbia foram obtidos do DANE Municípios, sentido 2010 (<http://www.dane.gov.co/index.php/poblacion-y-demografia/censos>), enquanto que os dados epidemiológicos do INS (<http://www.ins.gov.co/boletin-epidemiologico/Paginas/default.aspx>);

**Os dados demográficos do Brasil foram obtidos do IBGE Cidades, senso 2010 (<http://www.cidades.ibge.gov.br/>); enquanto que os dados epidemiológicos do DATASUS/Ministério da Saúde/ Brasil (TABNET: <http://www2.datasus.gov.br>);

***Mosquitos adultos criados em condições de laboratório resultantes dos ovos recolhidos no campo.

Tabela 4. Distribuição e frequência dos haplótipos (H) observados nos segmentos IIS6 (H1-15) e IIS6 (H16-17) do *Na_v* em populações de *Aedes aegypti* da Colômbia e Brasil.

H	Brasil									Colômbia				%
	JR	GM	PV	CL	SN	RO	VG	GV	FI	AR	CA	MO	BA	
H1	X	X	X	X	X	X	X	X	X					21,7
H2	X				X	X	X	X	X					21,0
H3										X	X	X	X	10,9
H4										X	X	X	X	10,9
H5		X	X	X			X	X	X					8,7
H6		X	X	X										8,0
H7										X	X	X	X	4,3
H8										X	X		X	2,9
H9										X	X	X		2,2
H10						X	X		X					2,2
H11													X	1,4
H12										X	X			1,4
H13					X	X								1,4
H14		X	X											1,4
H15						X		X						1,4
H16						X	X	X	X	X	X	X	X	18,0
H17	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	82,0

JR= Jaru; **GM**= Guajará-Mirim; **PV**= Porto Velho; **CL**= Cacoal; **SN**= Sinop; **RO**= Rondonópolis; **VG**= Varzea Grande; **GV**= Governador Valadares; **FI**= Foz do Iguaçu; **AR**= Armenia; **CA**= Calarcá; **MO**= Montenegro; **BA**= Barcelona.

Tabela 5. Sítios variáveis em 15 haplótipos (H) do segmento IIS6 do *Na_v* em populações de *Aedes aegypti* da Colômbia e Brasil. Os nucleotídeos em letras maiúsculas correspondem à região de codificação (Exon 20 e 21) e aqueles em letras minúsculas referem-se ao intron. Os sítios invariáveis estão indicados com pontos, caso contrário, com o nucleotídeo alternativo e os gaps com (-). Os nucleotídeos em preto referem-se à posição das mutações *kdr*.

H	Sítios polimórficos																									
	26	89	176	206	212	216	258	272	274	275	277	278	279	280	283	288	289	290	291	292	293	294	295	297	298	300
H1	A	A	A	g	t	a	g	t	c	a	c	a	c	t	a	t	c	a	g	g	t	t	g	a	t	g
H2	G	G	c	a	t
H3	G	G	.	a	a	g	a	.	g	t	a	t	t	c	-	-	-	-	-	-	-	c	t	g	.	a
H4	G	G	.	a	a	g	a	.	g	t	a	t	t	c	-	-	-	-	-	-	-	c	t	g	.	a
H5	.	.	G
H6	G	G	c	a	a	t
H7	G	G	.	a	a	g	-	-	a	t	t	t	c	.	c	g	g	.
H8	G	G	.	a	a	g	a	.	g	t	a	t	t	c	-	-	-	-	-	-	-	c	t	g	.	a
H9	.	.	G	-	-	a	t	t	t	c	.	c	g	g	.
H10
H11	.	.	G	-	-	a	t	t	t	.	.	c	g	g	.
H12	.	.	G	c	a	a	t	t	t	c	.	c	g	g	.
H13	G	c	a	t
H14	G	G	c	a	a	t
H15	G

Continua na página seguinte

Tabela 5. Sítios variáveis em 15 haplótipos (H) do segmento IIS6 do *Na_v* em populações de *Aedes aegypti* da Colômbia e Brasil. Os nucleotídeos em letras maiúsculas correspondem à região de codificação (Exon 20 e 21) e aqueles em letras minúsculas referem-se ao intron. Os sítios invariáveis estão indicados com pontos, caso contrário, com o nucleotídeo alternativo e os gaps com (-). Os nucleotídeos em preto referem-se à posição das mutações *kdr*.

H	Sítios polimórficos																									
	301	303	305	306	307	308	309	311	312	313	314	315	316	319	332	333	334	335	338	340	343	344	345	347	352	355
H1	c	g	a	g	t	t	c	a	t	c	g	a	a	c	t	t	t	g	a	c	c	a	a	a	a	c
H2
H3	.	-	-	a	a	a	g	c	c	a	t	c	t	g	g	c	g	g	c	a
H4	.	-	-	a	a	a	g	c	-	-	t	t	g	t	c	a	a	t	t	g	g	c	g	g	c	a
H5
H6
H7	a	t	g	a	.	.	g	t	.	a	t	c	t	g	g	c	g	.	c	a
H8	.	-	-	a	a	a	g	c	c	a	t	c	t	g	g	c	g	g	c	a
H9	a	t	g	a	.	.	g	t	.	a	t	c	t	g	g	c	g	.	c	a
H10
H11	a	t	g	a	.	.	g	t	.	a	t	c	t	g	g	c	g	.	c	a
H12	.	t	g	a	.	.	g	t	.	a	t	c	t	g	g	c	g	.	c	a
H13
H14
H15

Continua na página seguinte

Tabela 5. Sítios variáveis em 15 haplótipos (H) do segmento IIS6 do *Na_v* em populações de *Aedes aegypti* da Colômbia e Brasil. Os nucleotídeos em letras maiúsculas correspondem à região de codificação (Exon 20 e 21) e aqueles em letras minúsculas referem-se ao intron. Os sítios invariáveis estão indicados com pontos, caso contrário, com o nucleotídeo alternativo e os gaps com (-). Os nucleotídeos em preto referem-se à posição das mutações *kdr*.

[illegible]

Tabela 6. Resultado seleção do modelo de evolução nucleotídica (entre 24 modelos) usando o parâmetro Akaike (AICc).

Modelo	-lnL	K	AICc	Delta	Weight	cumWeight
HKY+G*	1363.36949	129	3248.833468	0.000000	0.560463	0.560463
F81+I	1368.62721	128	3251.254420	2.420952	0.167049	0.727511
F81+G	1368.72900	128	3251.458000	2.624532	0.150882	0.878393
HKY+I	1365.41742	129	3252.929328	4.095860	0.072301	0.950694
F81	1374.95577	127	3255.942548	7.109080	0.016026	0.966720
K80+G	1379.33210	126	3256.848815	8.015347	0.010187	0.976907
JC+G	1383.28290	125	3257.023815	8.190347	0.009333	0.986240
F81+I+G	1368.10320	129	3258.300888	9.467420	0.004929	0.991169
HKY+I+G	1364.35901	130	3259.035480	10.202012	0.003414	0.994582
K80+I	1381.22303	126	3260.630675	11.797207	0.001538	0.996120
HKY	1373.31919	128	3260.638380	11.804912	0.001532	0.997651
JC+I	1385.13558	125	3260.729175	11.89570	0.001464	0.999115
JC	1390.27196	123	3263.392405	14.558937	0.000386	0.999501
K80	1387.11479	123	3264.687595	15.854127	0.000202	0.999704
JC+I+G	1383.53993	126	3265.264475	16.431007	0.000152	0.999855
K80+I+G	1379.95283	127	3265.936668	17.103200	0.000108	0.999963
SYM+G	1369.07573	130	3268.468920	19.635452	3.05e-005	0.999994
SYM+I	1371.07953	130	3272.476520	23.643052	4.12e-006	0.999998
GTR+G	1359.57639	133	3274.941398	26.107930	1.20e-006	0.999999
GTR+I	1360.82577	133	3277.440158	28.606690	3.44e-007	1.000000
SYM	1378.48241	129	3279.059308	30.225840	1.53e-007	1.000000
SYM+I+G	1370.32255	131	3279.317100	30.483632	1.35e-007	1.000000
GTR	1366.12389	132	3279.409070	30.575602	1.29e-007	1.000000
GTR+I+G	1359.49242	134	3283.542217	34.708749	1.63e-008	1.000000

*Modelo selecionado; -lnL= Probabilidade; K= Numero de parâmetros do modelo; AICc= Valor Akaike; Delta= Diferença entre o valor AICc do melhor modelo com o modelo especificado; Weight= Peso do AICc; cumWeight= Peso acumulado do AICc.

Tabela 7. Frequências genotípicas Nav, considerando-se os sítios 1016 e 1534, de populações de *Aedes aegypti* da Colômbia e Brasil.

País	Região	Localidade	Estrato	n	Frequência genotípica						Teste HWE χ^2 , (df)**
					SS	SR1	SR2	R1R1	R1R2	R2R2	
Colômbia	Andina	Armênia	---	43	0,047	0,070	0,070	0,512	0,279	0,023	17,7, (3)
		Calarcá	---	40	0,075	0,025	0,025	0,625	0,200	0,050	22,6, (3)
		Montenegro	---	40	0,050	0,150	0,150	0,250	0,375	0,025	3,6, (3)*
		Barcelona	---	17	0,000	0,118	0,118	0,176	0,412	0,176	0,4, (3)*
Brasil	Norte	Jaru	---	30	0,700	0,033	0,000	0,000	0,100	0,167	27,1, (3)
		Guajará-Mirim	---	29	0,000	0,000	0,621	0,000	0,379	0,000	29,0, (3)
		Cacoal	---	29	0,034	0,000	0,000	0,172	0,655	0,138	32,7, (3)
		Porto Velho	---	30	0,000	0,033	0,000	0,067	0,900	0,000	23,0, (3)
	Centro-Oeste	Sinop	---	24	0,000	0,042	0,125	0,000	0,125	0,708	1,7, (3)*
		Várzea Grande	---	30	0,100	0,000	0,333	0,000	0,033	0,533	0,9, (3)*
		Rondonópolis	---	28	0,036	0,036	0,036	0,107	0,250	0,536	8,1, (3)
	Sudeste	Governador Valadares	---	26	0,000	0,000	0,000	0,154	0,769	0,077	0,0, (3)
	Sul	Foz do Iguaçu*	---	159	0,038	0,107	0,145	0,094	0,094	0,522	42,0, (3)
		Foz do Iguaçu	1	4	0,000	0,750	0,250	0,000	0,000	0,000	4,0, (3)*
			2	20	0,100	0,150	0,200	0,000	0,000	0,550	10,1, (3)
			3	20	0,000	0,150	0,300	0,050	0,100	0,400	3,9, (3)*
			5	20	0,050	0,150	0,250	0,050	0,100	0,400	2,6, (3)*
			6	20	0,000	0,050	0,050	0,100	0,050	0,750	10,6, (3)
			8	20	0,050	0,100	0,150	0,050	0,000	0,650	10,2, (3)
			9	20	0,050	0,100	0,100	0,200	0,100	0,450	8,5, (3)
			10	20	0,000	0,000	0,050	0,150	0,250	0,550	3,0, (3)*
			11	15	0,067	0,000	0,000	0,200	0,200	0,533	18,9, (3)

*= Foz do Iguaçu, somatório dos estratos 1-11; **= não significativo ($p > 0.05$).

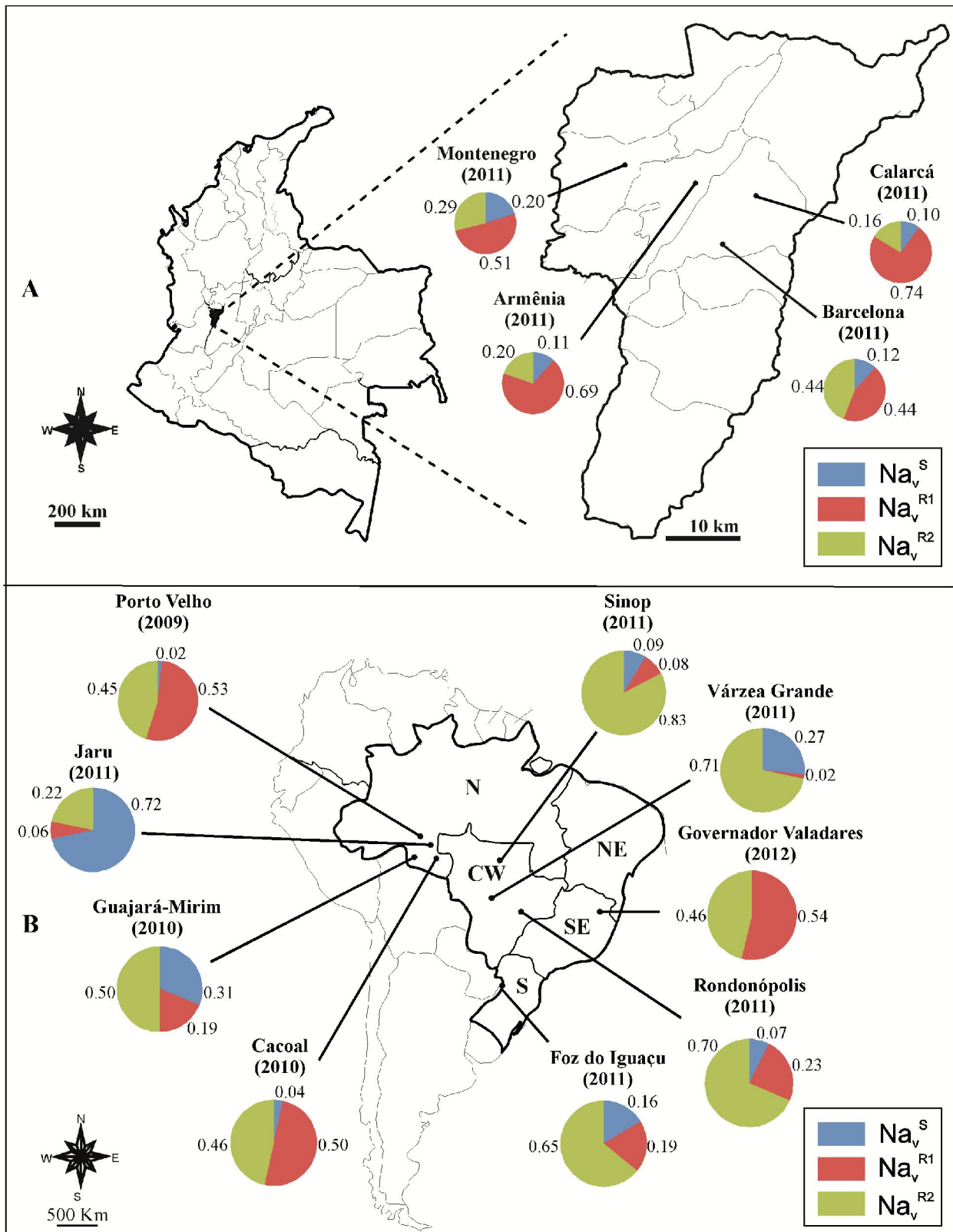


Figura 3. Frequência e distribuição dos alelos *kdr* Na_v^S , Na_v^{R1} e Na_v^{R2} das populações de *Aedes aegypti* da Colômbia (A) e Brasil (B). As cidades de coleta e o ano de amostragem (entre parêntesis) são colocados em cada mapa. No mapa da Colômbia é destacado o departamento do Quindío com cada uma das cidades de amostragem. No mapa do Brasil, são destacadas todas suas regiões: N= Norte, CW= Centro-Oeste, NE= Nordeste, SE= Sudeste, S= Sul.

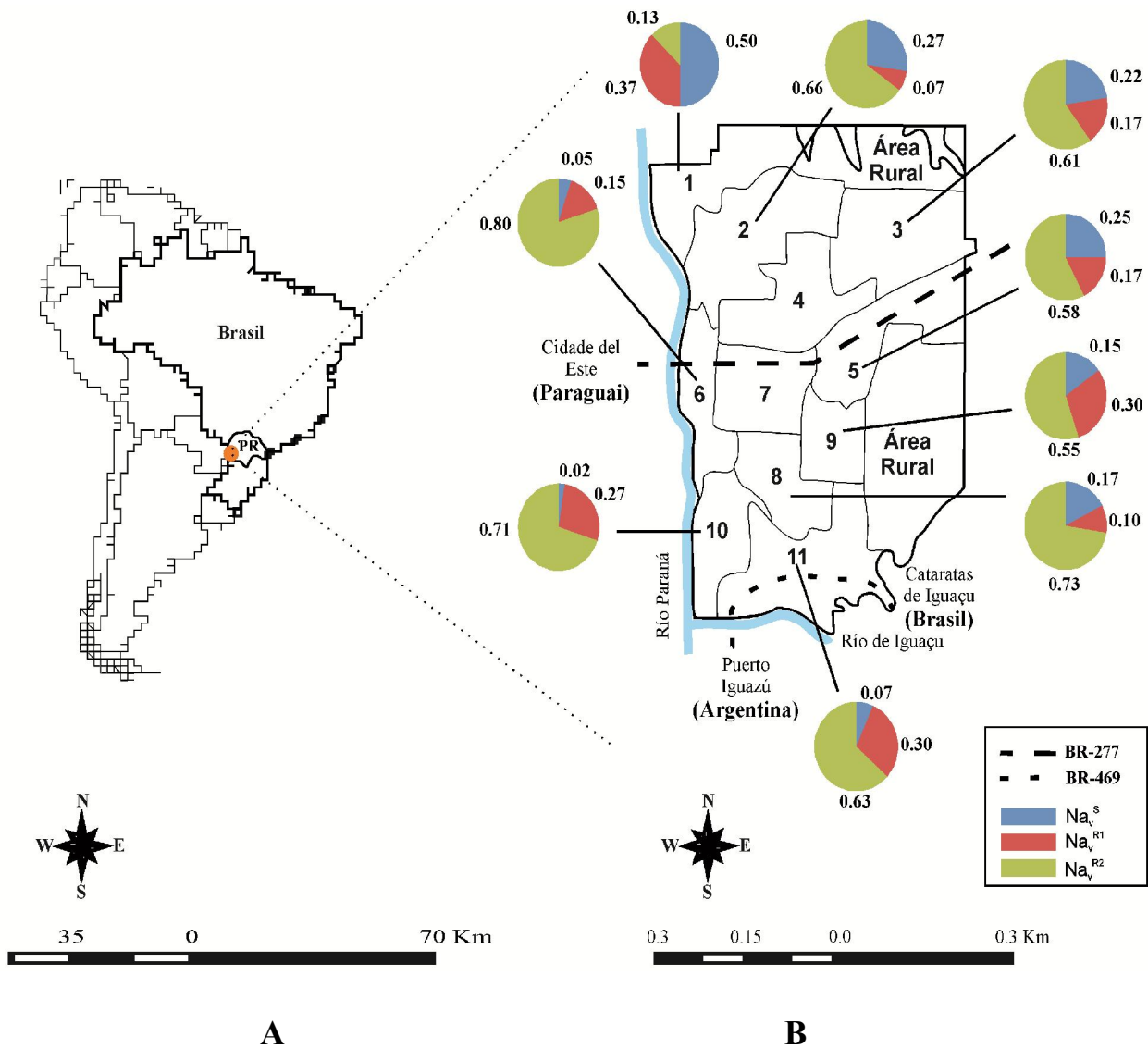


Figura 4. Frequência e distribuição dos alelos kdr Na_V^S , Na_V^{R1} e Na_V^{R2} das populações de *Aedes aegypti* do Foz de Iguaçu (B), Brasil (A). Os estratos de amostragem e as principais rodoviárias da cidade se apresentam no mapa.

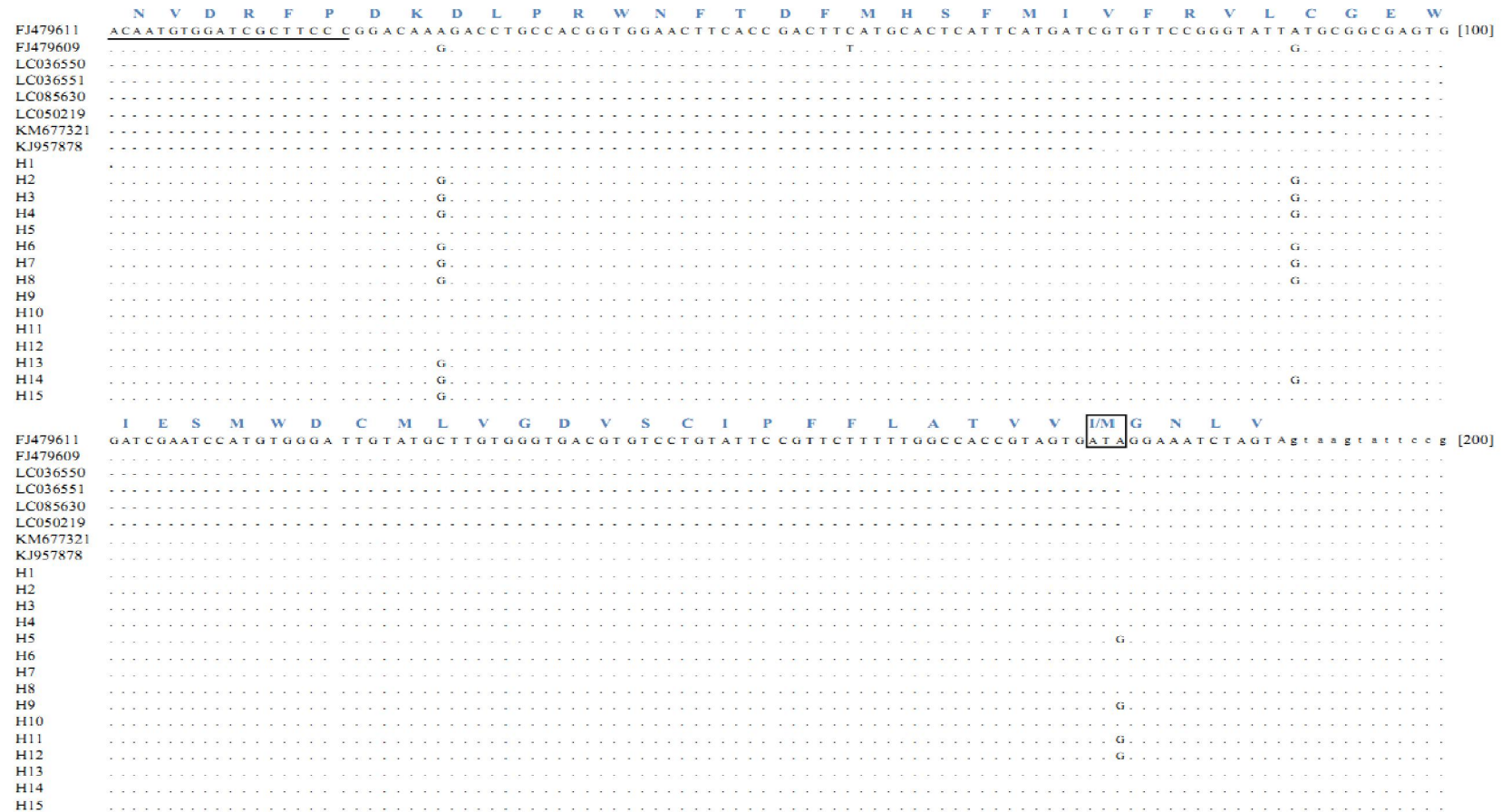


Figura 5. Diversidade nucleotídica no segmento IIS6 do Na_V em *Aedes aegypti*. Alinhamento ClustalW para comparar os haplótipos encontrados neste estudo (H1-15), com outras sequências genômicas de *Aedes aegypti* disponíveis no GenBank de Brasil, América do Sul [GenBank: FJ479609 e FJ479611], El Salvador, América Central [GenBank: LC036550], Gana, África Ocidental [GenBank: LC036551], Quênia, África Oriental [GenBank: LC085630], Malavi, África do Sul [GenBank: LC050219], Índia, Sul da Ásia [GenBank: KM677321] e Indonésia, Sudeste Asiático [GenBank: KJ957878]. A sequência traduzida de aminoácidos é representada pelas letras em azul, em relação ao primeiro nucleotídeo do seu códon correspondente. Os nucleotídeos em letras maiúsculas correspondem à região de codificação (Exões 20 e 21) e aqueles em letras minúsculas referem-se ao intron, com a numeração no alinhamento dentro de parênteses no topo de cada bloco, e sublinhado as sequências referentes às posições dos *primers*. Os sítios invariáveis estão indicados com pontos, caso contrário, com o nucleotídeo alternativo e os gaps com (-). Os quadrados indicam os códons em que as mutações *kdr* 1011 e 1016 estão presentes em *Aedes aegypti*.

Continua na página seguinte

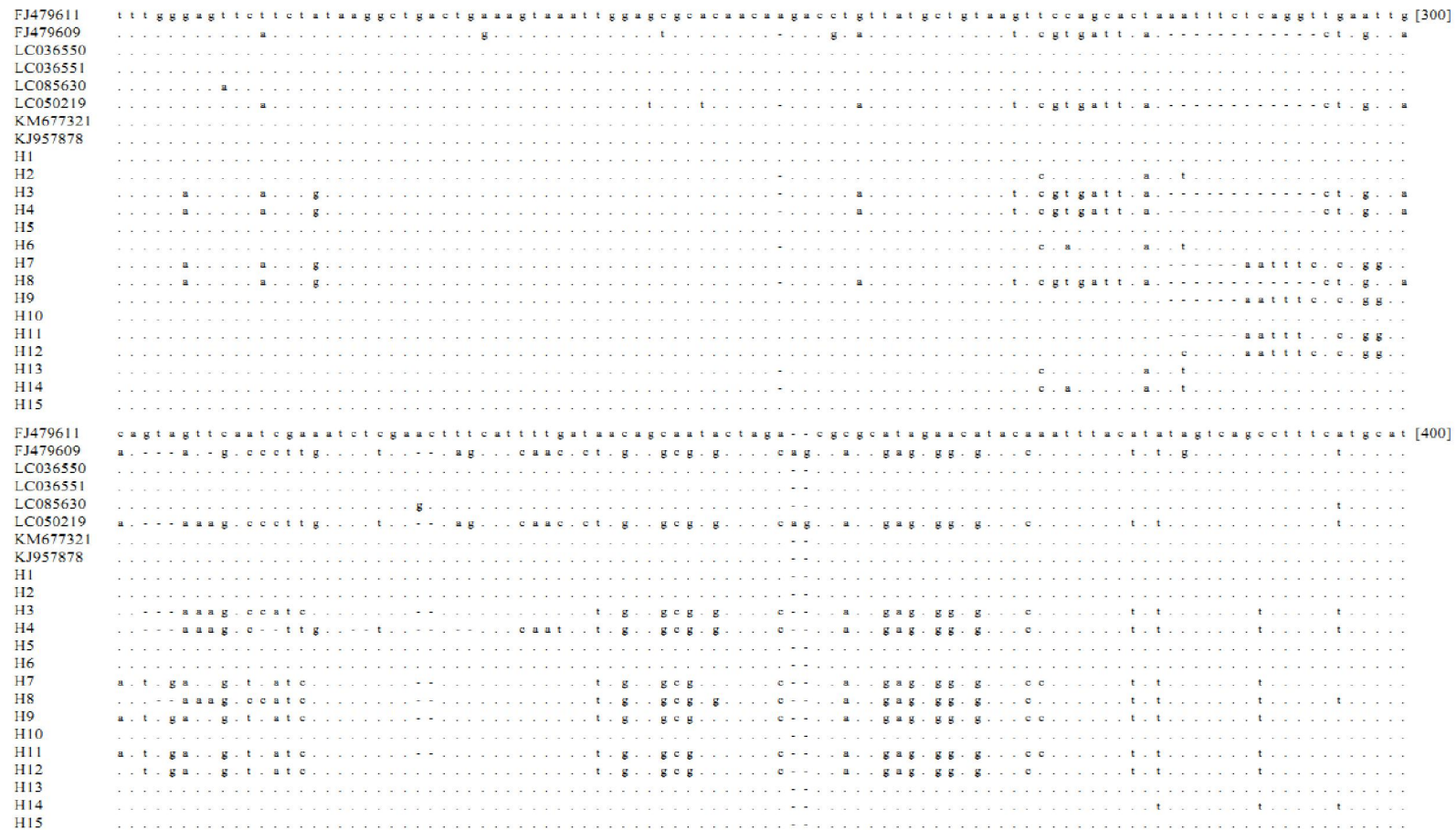


Figura 5. Diversidade nucleotídica no segmento IIS6 da *NaV* em *Aedes aegypti*. Alinhamento ClustalW para comparar os haplótipos encontrados neste estudo (H1-15), com outras sequências genômicas de *Aedes aegypti* disponíveis no GenBank de Brasil, América do Sul [GenBank: FJ479609 e FJ479611], El Salvador, América Central [GenBank: LC036550], Gana, África Ocidental [GenBank: LC036551], Quênia, África Oriental [GenBank: LC085630], Malavi, África do Sul [GenBank: LC050219], Índia, Sul da Ásia [GenBank: KM677321] e Indonésia, Sudeste Asiático [GenBank: KJ957878]. A sequência traduzida de aminoácidos é representada pelas letras em azul, em relação ao primeiro nucleotídeo do seu códon correspondente. Os nucleotídeos em letras maiúsculas correspondem à região de codificação (Exões 20 e 21) e aqueles em letras minúsculas referem-se ao intron, com a numeração no alinhamento dentro de parênteses no topo de cada bloco, e sublinhado as sequências referentes às posições dos *primers*. Os sítios invariáveis estão indicados com pontos, caso contrário, com o nucleotídeo alternativo e os gaps com (-). Os quadrados indicam os códons em que as mutações *kdr* 1011 e 1016 estão presentes em *Aedes aegypti*.

Continua na página seguinte

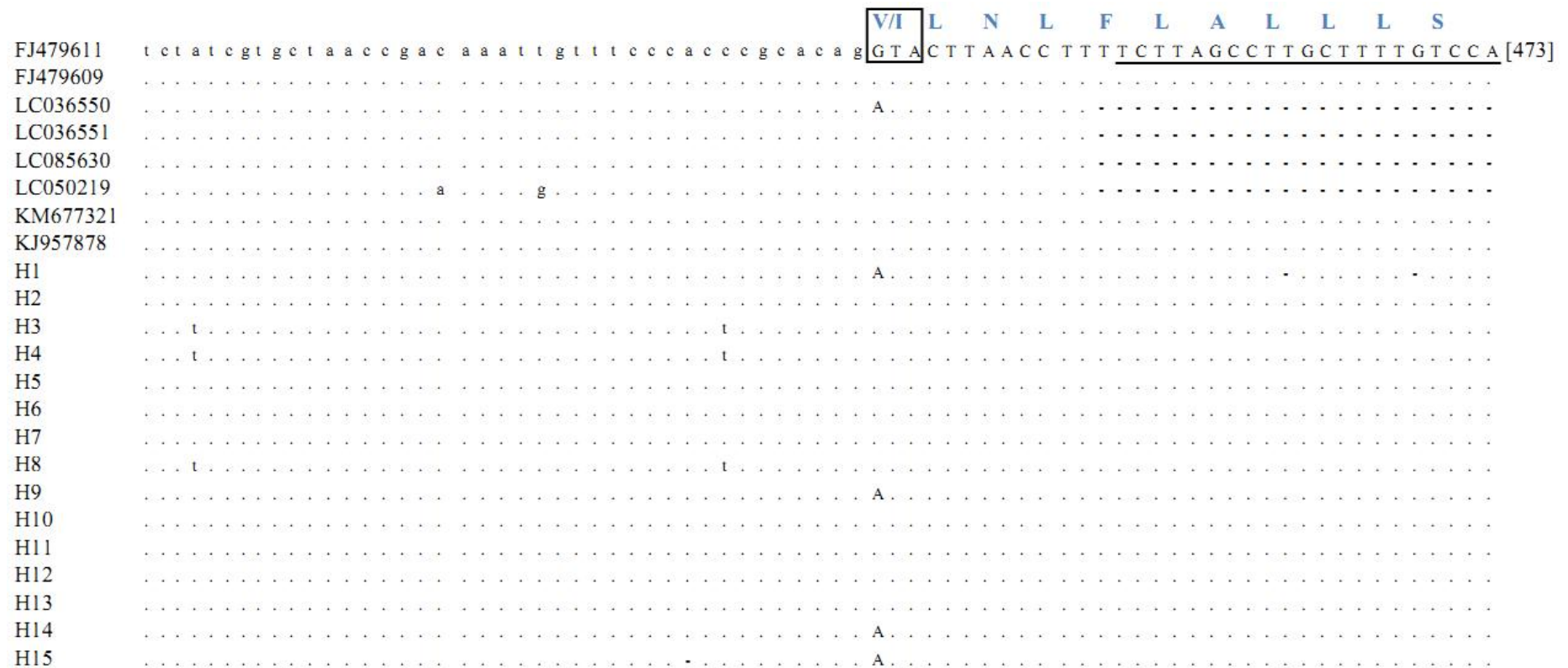


Figura 5. Diversidade nucleotídica no segmento IIS6 do *Na_v* em *Aedes aegypti*. Alinhamento ClustalW para comparar os haplótipos encontrados neste estudo (H1-15), com outras sequências genômicas de *Aedes aegypti* disponíveis no GenBank de Brasil, América do Sul [GenBank: FJ479609 e FJ479611], El Salvador, América Central [GenBank: LC036550], Gana, África Ocidental [GenBank: LC036551], Quênia, África Oriental [GenBank: LC085630], Malawi, África do Sul [GenBank: LC050219], Índia, Sul da Ásia [GenBank: KM677321] e Indonésia, Sudeste Asiático [GenBank: KJ957878]. A sequência traduzida de aminoácidos é representada pelas letras em azul, em relação ao primeiro nucleotídeo do seu códon correspondente. Os nucleotídeos em letras maiúsculas correspondem à região de codificação (Exões 20 e 21) e aqueles em letras minúsculas referem-se ao intron, com a numeração no alinhamento dentro de parênteses no topo de cada bloco, e sublinhado as sequências referentes às posições dos *primers*. Os sítios invariáveis estão indicados com pontos, caso contrário, com o nucleotídeo alternativo e os gaps com (-). Os quadrados indicam os códons em que as mutações *kdr* 1011 e 1016 estão presentes em *Aedes aegypti*.

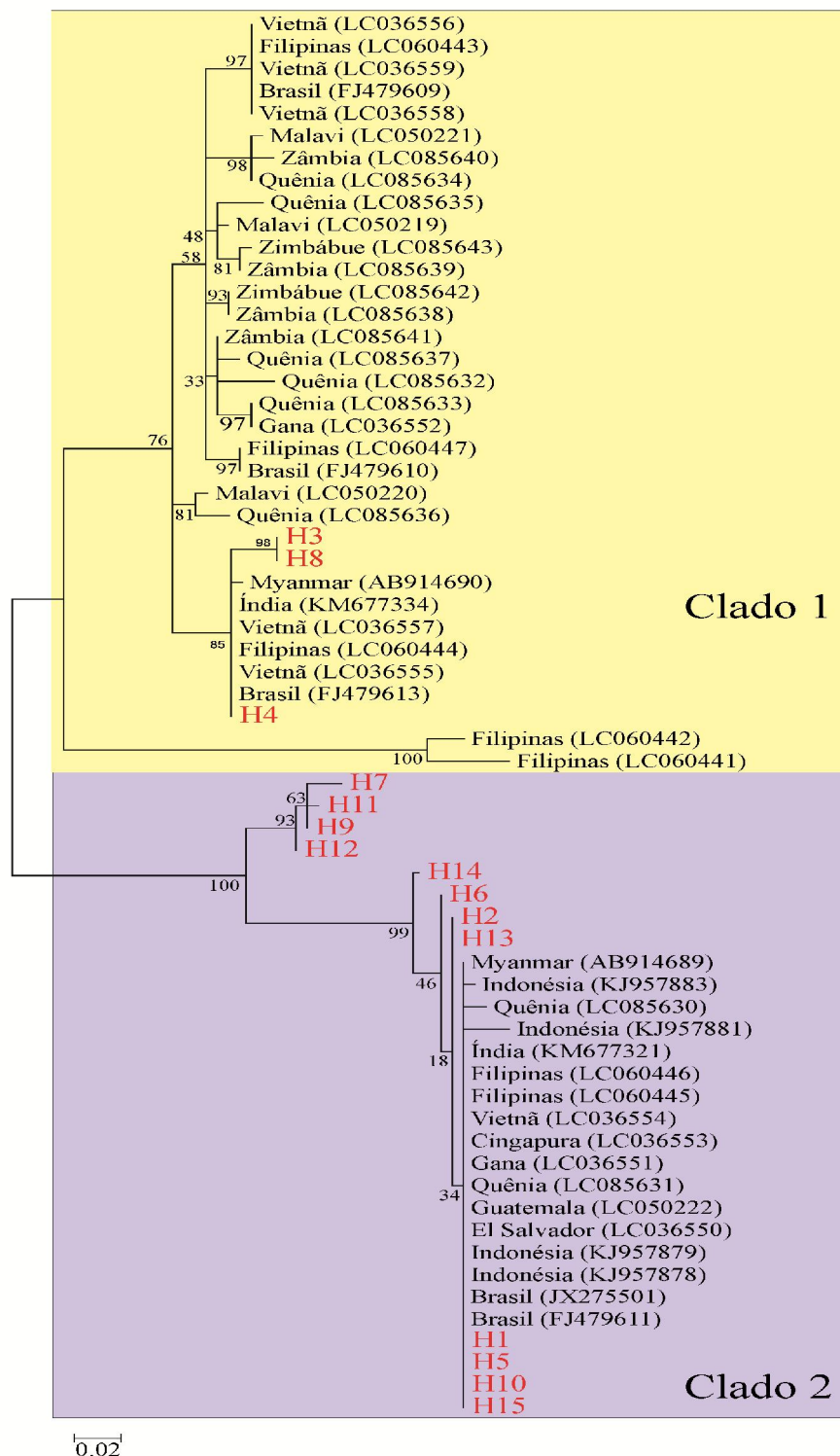


Figura 6. Análise de máxima verossimilhança de *Aedes aegypti*. A história evolutiva foi inferida usando o modelo Hasegawa-Kishino-Yano + Gamma Distributed (HKY+G) tal como sugerido pelo jModelTest 2.1.10. A árvore de máxima verossimilhança foi obtido usando o algoritmo *Subtree-Pruning-Regrafting - Extensive* (SPR nível 5). A árvore está desenhada à escala, com comprimentos dos ramos calculados usando o método *Very Strong*. Os percentuais de árvores idênticas, em que as sequências associadas agrupadas no teste *bootstrap* (1,000 replicas) são apresentadas ao lado dos ramos. Os haplótipos deste trabalho são apresentados na árvore em vermelho.

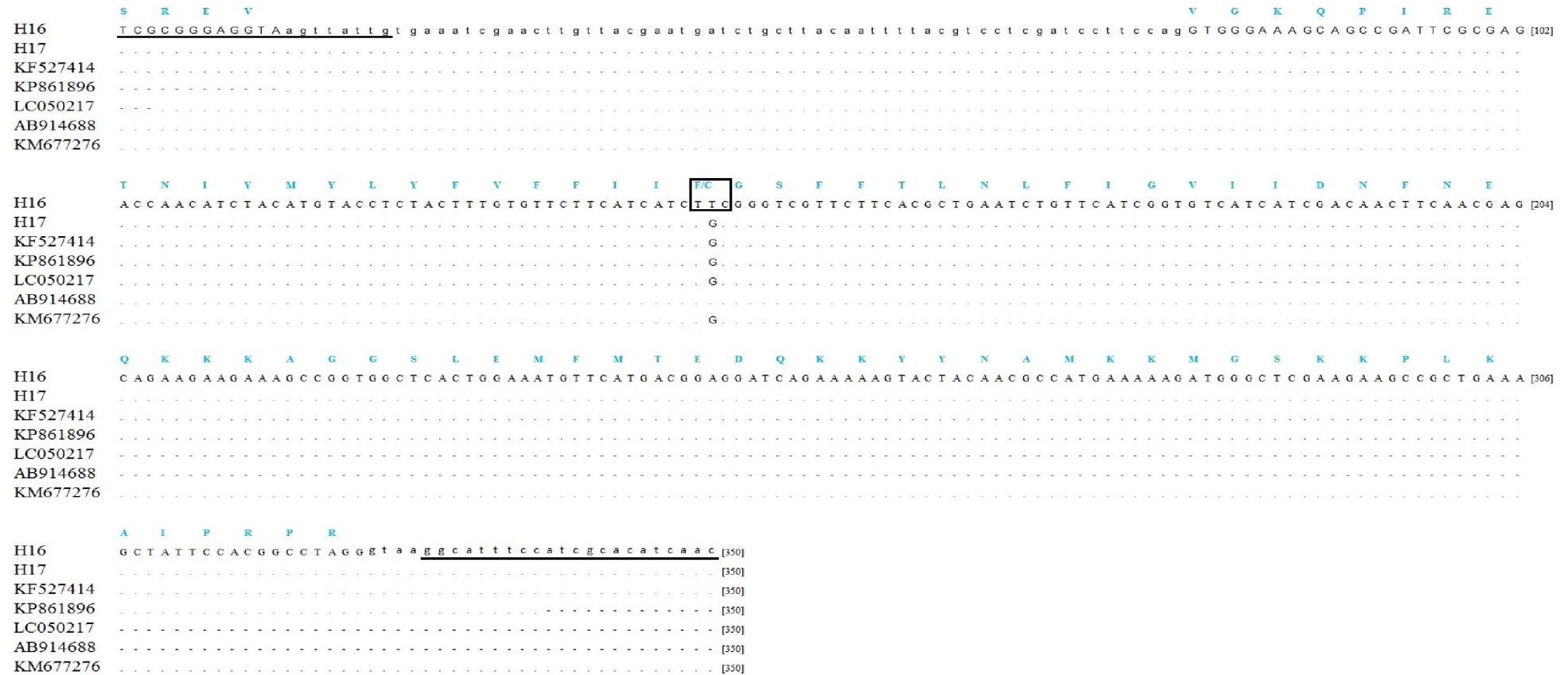


Figura 7. Diversidade nucleotídica no segmento IIIS6 do *Na_v* em *Aedes aegypti*. Alinhamento ClustalW para comparar os haplótipos encontrados neste estudo (H16 e H17), com outras sequências genômicas de *Aedes aegypti* disponíveis no GenBank de Brasil [GenBank: KF527414] e Colômbia (GenBank: KP861896), América do Sul, Gana, África [GenBank: LC050217], Myanmar, Sudeste Asiático [GenBank: AB914688] e Índia, Sul da Ásia [GenBank: KM677276]. A sequência traduzida de aminoácidos é representada pelas letras em azul, em relação ao primeiro nucleotídeo do seu códon correspondente. Os nucleotídeos em letras maiúsculas correspondem à região de codificação (Exões 30 e 31) e aqueles em letras minúsculas referem-se ao intron, com a numeração no alinhamento dentro de parênteses no topo de cada bloco, e um sublinhado simples nas sequências se refere às posições dos *primers*. Os sítios invariáveis estão indicados com pontos, caso contrário, com o nucleotídeo alternativo e os gaps com (-). O sítio *kdr* 1534 é indicado com um quadrado.

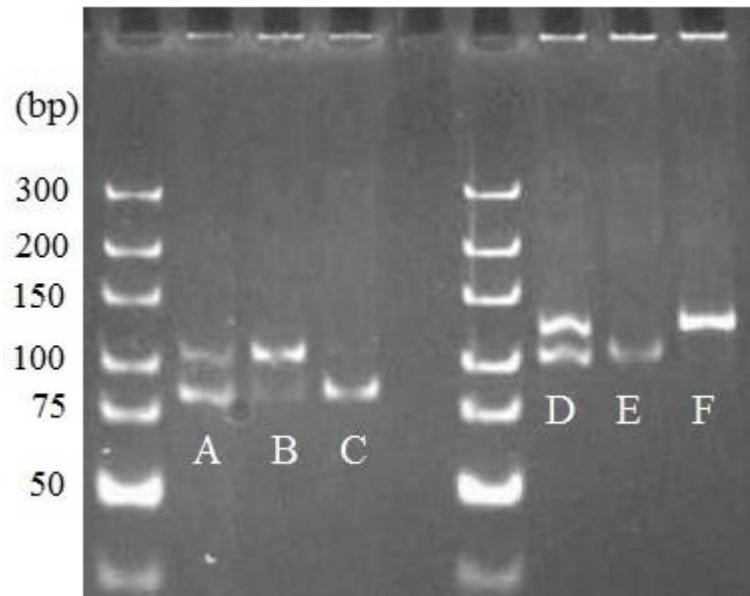


Figura 8. Visualização dos produtos de amplificação para os sítios *kdr* 1016 e 1534 em uma eletroforese em gel de poliacrilamida a 10%, sob condições de corrida: 170 V/45'. No gel, são apresentados todos os genótipos observados para cada sítio *kdr*. Para o sítio *kdr* 1016, os produtos PCR **A**, **B** e **C** correspondem aos genótipos: heterozigoto ($\text{Val}^+/\text{Ile}^{kdr}$), selvagem ($\text{Val}^+/\text{Val}^+$) e mutante ($\text{Ile}^{kdr}/\text{Ile}^{kdr}$). Por sua parte, para o sítio *kdr* 1534, **D**, **E** e **F** aos genótipos: heterozigoto ($\text{Phe}^+/\text{Cys}^{kdr}$), selvagem ($\text{Phe}^+/\text{Phe}^+$) e mutante ($\text{Cys}^{kdr}/\text{Cys}^{kdr}$). O DNA *ladder* (no primeiro e sexto poço) foi utilizado como indicador de peso molecular (pb= pares de bases).

5.2. Populações de *A. albopictus*.

No total da amostragem, *A. albopictus* representou em média 6,4% dos ovos recolhidos, sendo o restante *A. aegypti*. O levantamento de alguns dados demográficos e casos de dengue nas localidades amostradas, conforme apresentados na Tabela 8, indicam que as localidades com menor percentagem de *A. albopictus* são aquelas com a maior densidade de pessoas que vivem em áreas urbanas, as quais historicamente tem apresentado o maior número de casos de dengue. Este dado corrobora a hipótese da baixa participação de *A. albopictus* nas epidemias de dengue no Brasil.

Tal qual como acima apresentado para *A. aegypti*, foi investigada a diversidade nucleotídica das regiões IIS6 e IIS6 do *Na_v* de *A. albopictus* dos Estados Rondônia (Região Norte), Mato Grosso (Região Centro-Oeste) e Paraná (Região Sul). Para a região IIS6, obteve-se ao todo 96 sequências, que diferentemente do observado em *A. aegypti*, apresentou apenas dois haplótipos, com a diferença de apenas uma inserção na região do intron [GenBank: KX281169 e KX281170]. Ou seja, nenhuma substituição não sinônima foi encontrada. Ambos os haplótipos, IIS6_H1 (52.6%) e IIS6_H2 (47.4%), foram encontrados em clones representativos nos três Estados analisados (Tabela 9). A Figura 10 apresenta um alinhamento destes haplótipos com três sequências do genoma de *A. albopictus* disponíveis no GenBank, originárias do Brasil [GenBank: FJ479615], Malásia [GenBank: KC152045] e Japão [GenBank: AB827810], evidenciando alta similaridade entre estas sequências.

Referente ao segmento IIS6 do *Na_v*, a partir de 96 sequências de clones, dois haplótipos também foram detectados. Neste caso, o SNP TTC/TGC acarretou uma substituição não sinônima correspondente à mutação *kdr* Phe1534Cys. O haplótipo 1534Cys^{*kdr*} esteve presente em clones dos Estados de Paraná (20.8%) e Rondônia (3.1%), mas não no Estado de Mato Grosso (Tabela 9). As sequências dos haplótipos 1453Phe⁺ e 1534Cys^{*kdr*} foram submetidas ao GenBank [GenBank: KX371864 e KX371865]. A Figura 11 apresenta um alinhamento dos haplótipos encontrados no segmento IIS6 do *Na_v* e algumas das poucas sequências homólogas disponíveis no GenBank para a região em *A. albopictus*: uma sequência de DNA [GenBank: AB827824] e duas sequências de mRNA [GenBank: KC152046 e AY663382], nenhuma delas cobrindo a totalidade de nossas sequências. Uma sequência homóloga de *A. aegypti* [GenBank: KF527415] também foi adicionada no alinhamento, mostrando

que os *primers* para a AS-PCR desenvolvidos para o sítio 1534 desta espécie são também adequados para *A. albopictus*.

Uma vez que a mutação *kdr* Phe1534Cys foi evidenciada em nossas amostras, foram avaliadas para o sítio *kdr* 1534 as frequências alélicas e genotípicas para cada municipalidade. A Figura 12 apresenta os genótipos observados nas populações do tigre-asiático para o sítio *kdr* 1534, os quais foram utilizados para calcular as frequências genotípicas e alélicas. O alelo 1534Cys^{*kdr*} variou entre 0 e 10% entre os seis municípios do estado do Paraná, de 3% em Porto Velho (Estado de Rondônia) e, novamente, não encontradas em Rondonópolis (Estado de Mato Grosso) (Figura 9). Em todos os casos, quando o alelo *kdr* foi encontrado, ele apareceu em heterozigotos. Em todos os casos, a hipótese de HW não teve suporte para ser rejeitada ($p > 0.05$) (Tabela 10).

Tabela 8. Dados demográficos, número de casos de dengue e numero de *Aedes aegypti/Aedes albopictus* obtidos das localidades amostradas.

Estado	Municipalidade	Informação demográfica*				Número de casos de dengue registrados anualmente **								Amostragem***		
		Habitantes	Residentes na área rural (%)	Área (Km ²)	Hab/Km ²	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	Ano de amostragem	<i>A. aegypti</i>	<i>A. albopictus</i>
Porto Velho	Porto Velho - RO	428.527	8,8	34.090,9	12,6	2.461	2.740	6.096	132	132	663	969	156	2010	9.203	162 (1,7%)
Mato Grosso	Rondonópolis - MT	195.476	3,8	4.159,1	47,0	718	2.524	2.728	344	1.568	3.271	652	1.960	2012	1.383	23 (1,6%)
Paraná	Nova Londrina	13.067	8,1	269,4	48,5	18	7	11	-	10	44	71	33	2014	236	21 (8,2%)
	Alvorada do Sul	10.283	28,6	424,3	24,2	202	84	301	392	46	189	112	86	2014	219	17 (7,2%)
	Cianorte	69.958	11,0	811,7	86,2	282	210	684	90	35	82	67	102	2009	1.181	262 (18,2%)
	Marilena	6.858	27,3	232,4	29,5	7	-	1	1	3	56	45	63	2014	143	16 (10,1%)
	Foz do Iguaçu	256.088	0,8	618,4	414,1	1.360	531	10.393	1.226	214	688	137	811	2009	5.544	73 (1,3%)
	Maringá	357.077	1,8	487,1	733,1	1.076	418	6.504	752	108	315	93	1.013	2012	13.436	393 (2,8%)

* Fonte: IBGE Cidades, sentido 2010 (<http://www.cidades.ibge.gov.br/>);

** Fonte: DATASUS/Ministério da Saúde/ Brasil (TABNET: <http://www2.datasus.gov.br/>);

*** Mosquitos adultos criados em condições de laboratório resultantes dos ovos recolhidos no campo.

Tabela 9. Distribuição e frequência dos haplótipos dos segmentos IIS6 e IIIS6 do *Na_v* do *Aedes albopictus* do Brasil.

Haplótipos	Frequência haplotípica (%)*			Total
	Paraná	Mato Grosso	Rôndonia	
IIS6 H1	36,7	5,3	10,6	52,6
IIS6 H2	34,2	4,0	9,2	47,4
1534Phe	41,7	12,5	21,9	76,1
1534Cys	20,8	0,0	3,1	23,9

* As frequências consideraram a quantidade total de clones apartir dos segmentos IIS6 ou IIIS6 do *Na_v*.

Tabela 10. Frequência genotípica do sítio 1534 do *Na_v* das oito populações de *Aedes albopictus* do Brasil.

Localidade	Ano de Amostragem	N	Frequência genotípica			HWE*
			Phe/Phe	Phe/Cys	Cys/Cys	χ^2 , p
PV	2010	37	0,95	0,05	0,00	0,002, ns
RO	2012	11	1,00	0,00	0,00	--
CN	2009	16	1,00	0,00	0,00	--
FI	2009	24	0,79	0,21	0,00	0,324, ns
MR	2012	24	0,87	0,13	0,00	0,107, ns
MA	2014	16	0,94	0,06	0,00	0,017, ns
NL	2014	21	1,00	0,00	0,00	--
AS	2014	17	1,00	0,00	0,00	--
PR**	2009-2014	118	0,92	0,08	0,00	0,185, ns

PV= Porto Velho; RO= Rondonópolis; CN= Cianorte; FI= Foz do Iguaçu; MR= Maringá; MA= Marilena; NL= Nova Londrina; AS= Alvorada do Sul; * Equilíbrio do Hardy-Weinberg: teste do qui-quadrado com 1 grau de liberdade; ns = não houve diferença significativa ($p > 0.05$); PR**= Estado do Paraná, soma dos municípios: CN, FI, MR, MA, NL e AS.

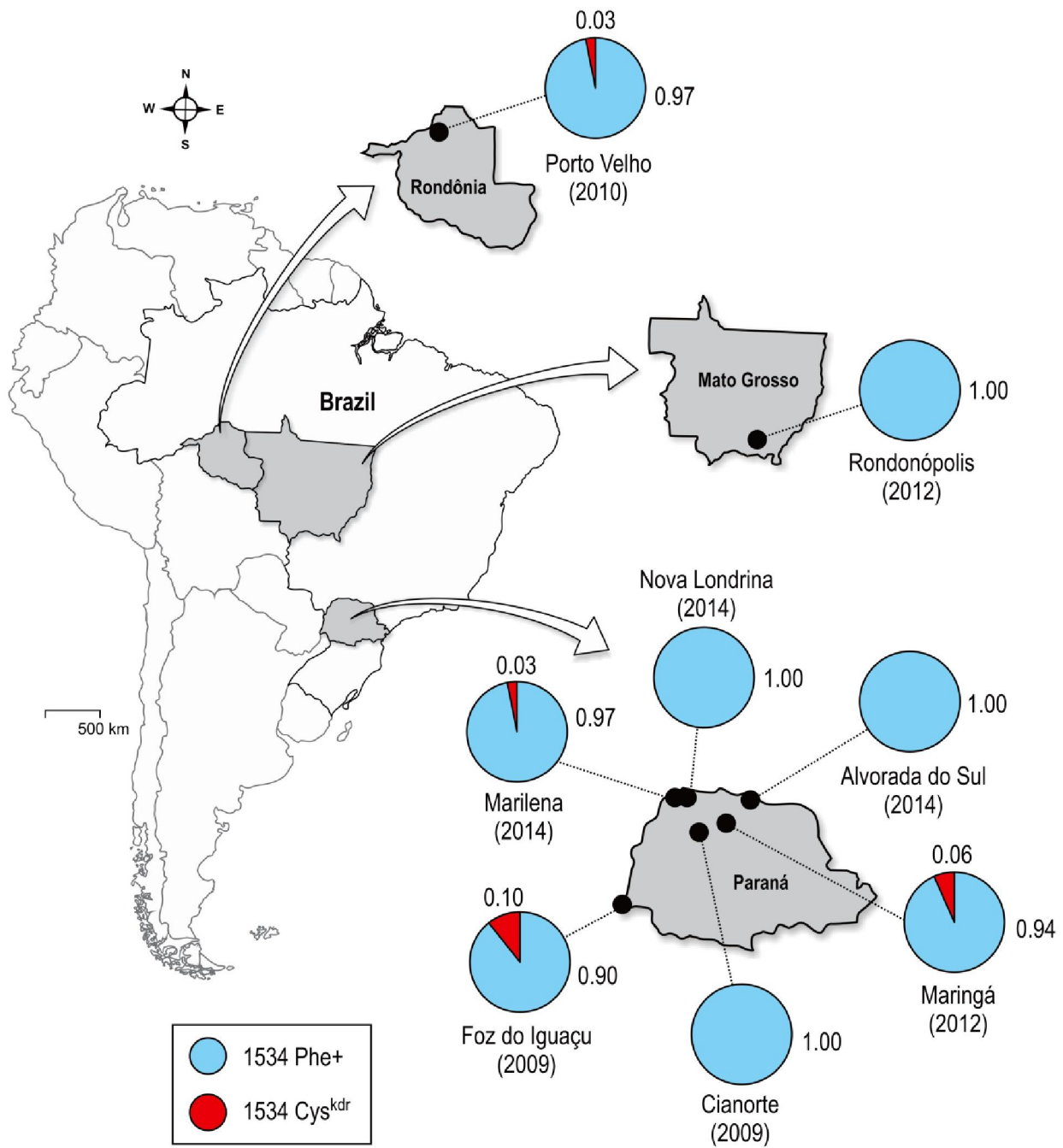


Figura 9. Frequências alélicas para o sítio 1534 das populações de *Aedes albopictus* do Brasil. Cidades/Estados de coleta e ano de amostragem (entre parêntesis) são colocados no mapa. É destacado o mapa do Paraná mostrando suas múltiplas cidades de coleção.

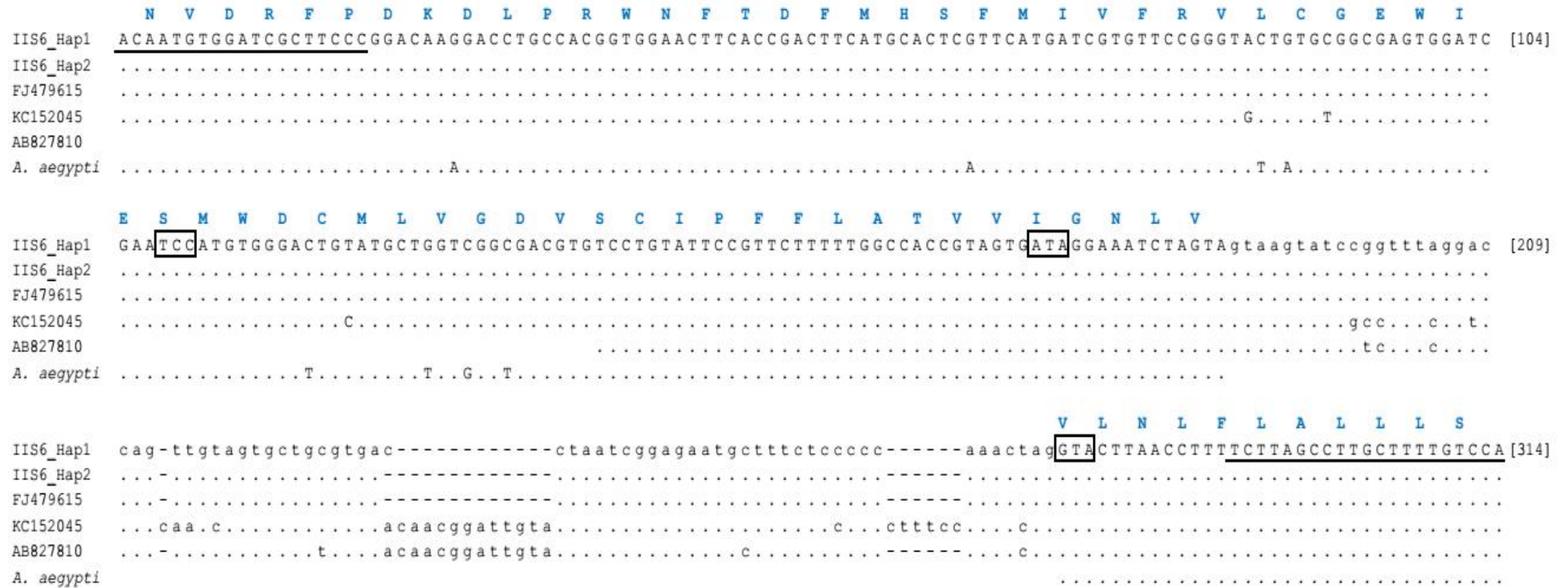


Figura 10. Diversidade nucleotídica no segmento IIS6 do *Nav* em *Aedes albopictus*. Alinhamento ClustalW para comparar os haplótipos encontrados neste estudo (IIS6_Hap1 [KX281169] e IIS6_Hap2 [KX281170]), com outras sequências genômicas de *Aedes albopictus* disponíveis no GenBank de Brasil [GenBank: FJ479615], Malásia [GenBank: KC152045] e Japão [GenBank: AB827810]. Um haplótipo de *Aedes aegypti* [FJ479611] foi incluso como uma questão de comparação, mas o intron foi negligenciado para não perturbar o alinhamento. A sequência AB827810 não cobre toda a extensão deste alinhamento. A sequência traduzida de aminoácidos é representada pelas letras em azul, em relação ao primeiro nucleótido do seu codon correspondente. Os nucleótidos em letras maiúsculas correspondem à região de codificação (Exões 20 e 21) e aqueles em letras minúsculas referem-se ao intron, com a numeração no alinhamento dentro de parênteses no topo de cada bloco, e sublinhado sequências referentes às posições dos *primers*. Os sítios invariáveis estão indicados com pontos, caso contrário, com o nucleotídeo alternativo e os *gaps* com (-). Os quadrados indicam os códons em que os locais das mutações *kdr* 989, 1011 e 1016 estão presentes em *Aedes aegypti*.



Figura 11. Diversidade nucleotídica no segmento IIS6 do *Na_v* em *Aedes albopictus*. Alinhamento ClustalW para comparar os haplótipos encontrados neste estudo 1534Phe [KX371864] e 1534Cys [KX371865]), com outras sequências genômicas de *Aedes albopictus* disponíveis no GenBank: um DNA genômico [GenBank: AB827824], um mRNA [GenBank: KC152046 e AY663382] e um haplótipo do *Aedes aegypti* [GenBank: KF527415]. As sequências importadas de *Aedes albopictus* não cobrem toda a extensão deste alinhamento. A sequência traduzida de aminoácidos é representada pelas letras em azul, em relação ao primeiro nucleótido do seu codon correspondente. Os nucleótidos em letras maiúsculas correspondem à região de codificação (Exões 30 e 31) e aqueles em letras minúsculas referem-se ao intron, com a numeração no alinhamento dentro de parênteses no topo de cada bloco, e um sublinhado simples nas sequências se refere às posições dos *primers*. O duplo sublinhado indica a região de anelamento para os *primers* da AS-PCR. Os sítios invariáveis estão indicados com pontos, caso contrário, com o nucleotídeo alternativo e os gaps com (-). O sítio *kdr* 1534 é indicado com um quadrado.

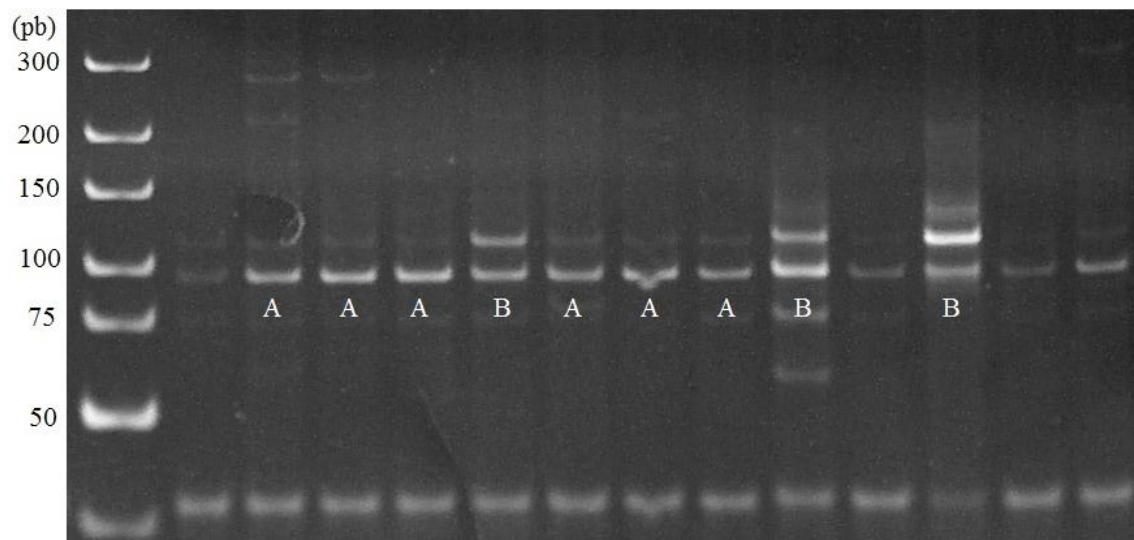


Figura 12. Visualização dos produtos de amplificação para o sítio *kdr* 1534 em uma eletroforese em gel de poliacrilamida a 10%, sob condições de corrida: 170 V/45'. No gel, são apresentados somente os genótipos observados, o genótipo selvagem (**A**= Phe⁺/Phe⁺) e o heterozigoto (**B**= Phe⁺/Cys^{*kdr*}). O DNA *ladder* (no primeiro poço) foi utilizado como indicador de peso molecular (pb= pares de bases).

6. DISCUSSÃO

A OMS recomenda cinco compostos a serem usados contra as formas adultas de mosquitos, entre os quais, quatro são PY e um OP (WHOPES 2013, 2014). O uso intenso de inseticidas tanto pelos órgãos públicos de controle de vetores quanto pelos cidadãos (i.e., aplicações constantes e para autoproteção), tem selecionado populações de mosquitos resistentes a praticamente todas as classes de inseticidas disponíveis até agora (Ranson et al. 2010; Smith et al. 2016; Vontas et al. 2012). Nas estratégias destinadas ao controle de vetores a prevenção estruturada em procedimentos de vigilância entomológica pode levar à utilização racional do controle químico. Este, contudo, quando utilizando como única ferramenta no controle de vetores, de forma exacerbada, pode apresentar como efeito colateral a seleção de populações resistentes, como tem ocorrido em *Aedes* spp globalmente (Smith et al. 2016).

É esperado que *A. aegypti* fosse mais atingido pela pressão de seleção aos inseticidas nas áreas urbanas do que *A. albopictus*, uma vez que aquele é mais antropofílico, endofágico e tem maior preferência pelos locais de ovoposição no ambiente antrópico (Kawada et al. 2009b; Rey & Lounibos 2015). De fato, a redução da susceptibilidade à PY tem sido menos proeminente em populações simpátricas de *A. albopictus* do que em populações de *A. aegypti*, como visto no Vietnã (Kawada et al. 2009b) e na Malásia (Ishak et al. 2015b). Neste último exemplo, duas mutações *kdr* (Val1016Gly e Phe1534Cys) foram ainda observadas em *A. aegypti*, mas não em *A. albopictus*.

As mutações *kdr* estão altamente relacionadas com resistência aos PY em muitas espécies de insetos, incluindo mosquitos vetores de arbovírus e, por conseguinte, elas são utilizadas como marcador molecular para avaliação indicativa de resistência (Donnelly et al. 2016; Rinkevich et al. 2013). A presença de mutações *kdr* relacionadas com resistência aos PY em *A. aegypti* e *A. albopictus* é um problema global (Smith et al. 2016). Estudos prévios em algumas populações de *A. aegypti* de América Latina evidenciaram a presença das mutações Ile1011Met, Val1016Ile e Phe1534Cys (Aguirre-Obando et al. 2015; Brengues et al. 2003; Linss et al. 2014; Martins et al. 2009b; Vera-Maloof et al. 2015), enquanto que nas populações de *A. albopictus* do mesmo continente, somente substituições no sítio 1534 tem sido relatadas, bem como em populações da Ásia (local de origem desta espécie e primeiro registro da mutação

Phe1534Cys) (Kasai et al. 2011; Marcombe et al. 2014). Neste estudo é relatada pela primeira vez a presença da mutação Phe1534Cys em populações de *A. albopictus* do Brasil, assim como três mutações *kdr* (Ile1011Met e Val1016Ile no segmento IIS6 e Phe1534Cys no IIIS6) nas populações de *A. aegypti* analisadas, sendo a substituição no sítio1011 relatada pela primeira vez para Colômbia.

A mutação *kdr* Ile1011Met foi relatada pela primeira vez em populações brasileiras de *A. aegypti* do Belém (Estado do Pará) (Bregues et al. 2003), posteriormente, foi registrada em Nova Iguaçu (Estado do Rio de Janeiro), Natal (Estado de Rio Grande do Norte) (Martins et al. 2009a), Juazeiro do Norte, Barbalha e Crato (Estado de Ceará) (Lima et al. 2011). Depois, também em populações de *A. aegypti* do Brasil, foram observadas ao longo do segmento IIS6, as mutações *kdr* Ile1011Met e Val1016Ile. No entanto, nenhuma das duas mutações foi encontrada no mesmo haplótipo (Martins et al. 2013); uma tendência também confirmada aqui. De acordo com Martins et al (2013), a mutação Ile1011Met faz parte de uma duplicação recente no gene *Nav* de *A. aegypti*. O alelo duplicado teria uma cópia sem mutação no segmento IIS6 e outra com a mutação Ile1011Met e vem sendo gradativamente substituindo pelos alelos *kdr Nav*^{R1} e *Nav*^{R2} no Brasil.

De fato, evidências sobre envolvimento de substituições no *Nav* de *A. aegypti* com a resistência a PY são mais conclusivos para os sítios 1016 e 1534, tanto em populações do campo (Kasai et al. 2014; Linss et al. 2014; Vera-Maloof et al. 2015) como em pressão de seleção em condições de laboratório (Alvarez et al. 2015; Brito et al. 2013; Kasai et al. 2014). Estudos prévios registraram a presença das mutações Val1016Ile e Phe1534Cys em varias populações de *A. aegypti* da América Latina (Alvarez et al. 2015; Vera-Maloof et al. 2015), incluindo Colômbia (Aguirre-Obando et al. 2015; Atencia et al. 2016) e, Brasil (Chapadense et al. 2015; Linss et al. 2014), reforçados aqui como este estudo.

Entre as localidades onde as mutações Val1016Ile e Phe1534Cys em alta frequência para *A. aegypti* e Phe1534Cys em baixa frequência para *A. albopictus* foram detectados, Armênia, Calarcá, Montenegro (Colômbia) (Castrillón et al. 2015), Porto Velho, Sinop, Várzea Grande, Maringá e Foz do Iguaçu (Brasil) são grandes centros urbanos, com alta incidência de surtos de dengue (Bona et al. 2012; Duque et al. 2010; Heinen et al. 2015; Lucena et al. 2011). Portanto, a fim de reduzir os surtos da dengue, os programas de

controle vetorial da Colômbia e Brasil devem ter aplicado em grande escala inseticidas; como consequência as populações de *A. aegypti* dessas localidades têm aumentado as frequências dos alelos *kdr* envolvidos com resistência aos PY (Aguirre-Obando et al. 2015; Bellinato et al. 2016; Bona et al. 2012; Linss et al. 2014), como observado neste estudo.

Referente às populações avaliadas do Estado do Quindío na Colômbia, não se tem dados de resistência aos PY. No entanto, populações de *A. aegypti* do Departamento de Valle del Cauca, localizado ao Sul do Quindío (aproximadamente 180 km), apresentam alteração no estado de susceptibilidade ao PY lambdaacyhalothrin (85% mortalidade) e resistência ao DDT (14% mortalidade) (Ocampo et al. 2011). No Brasil, entre as populações avaliadas, previamente tem sido observada resistência aos PY junto com a presença da mutação Val1016Ile para Foz do Iguaçu (cipermetrina: 72% e deltametrina: 57%) (Bona et al. 2012). Embora não há dados sobre resistência para as demais populações, estudos prévios no Brasil indicam a disseminação ao longo do país da resistência aos PY em conjunto com a presença das mutações *kdr* Val1016Ile e Phe1534Cys aqui observadas (Aguirre-Obando et al. 2016; Chapadense et al. 2015; Lima et al. 2011; Linss et al. 2014; Martins et al. 2009b; Valle et al. 2015). Entretanto, as altas frequências dos alelos *kdr* aqui observados, sugerem que deve apresentar-se resistência nas localidades avaliadas de ambos os países. No entanto, bioensaios utilizando PY devem ser realizados nas populações genotipadas, a fim de confirmar seu estado de susceptibilidade.

Foz do Iguaçu no Brasil merece uma atenção especial, uma vez que faz fronteira com Puerto Iguazú/Argentina e Ciudad del Este/Paraguay. Adicionalmente, os dados de resistência aos inseticidas para *A. aegypti* e *A. albopictus* de Foz do Iguaçu tem evidenciado perda de susceptibilidade ao larvicida OP Temephos para ambas as espécies coletadas em 2007 (Prophiro et al. 2011a), assim como resistencia aos PY deltametrina e cipermetrina em *A. aegypti* coletados em 2008 (Bona et al. 2012). As mutações Val1016Ile e Phe1534Cys provavelmente estão relacionadas à resistência aos PY detectado nas populações de *A. aegypti* de Foz do Iguaçu (Bona et al. 2012; Linss et al. 2014).

Os PY são amplamente utilizados na Colômbia e no Brasil para o controle de *A. aegypti*, o principal vetor de dengue, chikungunya e Zika (Lima et al. 2011; MinSalud et

al. 2011). Contudo, *A. albopictus* não está envolvido como vetor dessas arbovíroses na América do Sul, mas compartilha nichos ecológicos com *A. aegypti* nas áreas urbanas, sofrendo, portanto a mesma pressão de seleção pelos inseticidas usados para seu controle (Carvalho et al. 2014). Neste sentido, as mutações *kdr* 1016Ile e 1534Cys detectado em *A. aegypti* e a 1534Cys em *A. albopictus* neste estudo poderiam ter sido favorecidos pelo constante uso de PY empregados em ultra baixo volume orientados pelos programas de controle vetorial colombiano entre 1970-2010 (Boshell et al. 1986; Castrillón et al. 2015) e brasileiro entre 2001-2009 (Montella et al. 2007). Consequências semelhantes como resistência aos PY, juntamente com um aumento e disseminação dos alelos *kdr* detectados em populações brasileiras (Linss et al. 2014), e colombianas (Aguirre-Obando et al. 2015; Atencia et al. 2016; Conde et al. 2015; Santacoloma et al. 2010) de *A. aegypti*, pode ter lugar também com as populações de *A. albopictus* do Brasil. Este padrão também poderia se estender para as populações do tigre-asiático presentes no departamento do Quindío (Zamora-Delgado et al. 2015) e da Colômbia em geral (Rúa-Urbe et al. 2012).

Em *A. albopictus*, tem sido sugerido que a mutações *kdr* no sítio 1534 poderia ter sido selecionada pelo uso do DDT, devido à sua detecção em populações do tigre-asiático da América do Norte resistentes ao DDT (Marcombe et al. 2014). De fato, a resistência ao DDT está amplamente disseminada mundialmente em populações de *A. albopictus*, especialmente na Ásia, local de origem do tigre-asiático (Brown 1986; Cui et al. 2006; Vontas et al. 2012). No entanto, no Brasil, o DDT não é mais usado desde 1985 (Braga & Valle 2007b), isto é, prévio à invasão do *A. albopictus* no país. Bioensaios com populações naturais, considerando vários genótipos no gene do *Na_v* a fim de confirmar o estado de susceptibilidade destas populações para PY devem ser realizados. Além disso, uma análise filogenética utilizando sequências do segmento IIS6 e marcadores neutros para *A. albopictus* de diferentes partes do mundo poderiam ajudar a explicar se a mutação *kdr* Phe1534Cys surgiu de forma independente no Brasil ou migrou de outro local.

Por outra parte, para *A. aegypti* na Colômbia, a presença e distribuição das mutações *kdr* Val1016 e Phe1534Cys ao longo do país são pouco estudadas. Até agora, sabe-se que a presença da substituição 1016 em algumas populações de *A. aegypti* da Colômbia das regiões Caribe e Andes (Aguirre-Obando et al. 2015; Maestre-Serrano et al. 2014), enquanto a substituição 1534 só foi relatada em algumas populações do vetor na região

do Caribe (Atencia et al. 2016). No entanto, como observado na literatura e em nossos resultados, a resistência aos PY está relacionada com a seleção sequencial das duas mutações: Val1016Ile e Phe1534Cys (Kasai et al. 2014; Linss et al. 2014; Vera-Maloof et al. 2015). Portanto, nossos resultados para as populações de *A. aegypti* da Colômbia, revelam a necessidade de acompanhar outras populações principalmente, onde o ressurgimento de dengue, chikungunya e Zika permanecem.

Neste trabalho, o alelo Na_V^{R1} (substituição restrita ao sítio 1534) foi detectado em todas as populações de *A. aegypti* da Colômbia e Brasil, variando entre 0,06 (Jaru, Brasil) e 0,74 (Calarcá, Colômbia) e o Na_V^{R2} (substituições simultâneas em ambos os sítios 1016 e 1534) variando entre 0,16 (Calarcá, Colômbia) e 0,83 (Sinop, Brasil). O alelo Na_V^{R2} tem um alto custo adaptativo em ambientes livres de inseticida (Brito et al. 2013), no entanto vem aumentando rapidamente no Brasil (Linss et al. 2014), mesmo após a interrupção do uso de PY em campanhas nacionais (dados não mostrados). Isto sugere que o uso doméstico desta classe de inseticida deve ter influência direta na seleção e manutenção dos alelos *kdr* no ambiente e, conseqüentemente, na resistência a PY.

Em *A. albopictus*, as frequências do alelo *kdr* 1534Cys foram mais baixas, variando entre 0,03 até 0,10 nas populações do Brasil, o que pode significar um início de seleção para a resistência nestas populações. Em Singapura, por exemplo, a frequência daquela mutação foi de 0,73 (Kasai et al. 2011). O fenótipo de resistência a PY mediado pelas mutações *kdr* é esperado que seja recessivo, ou seja somente apresentado por indivíduos homozigotos (Dong et al. 2014). Por conseguinte, uma vez que estas mutações surgem ou são importadas em baixa frequência, demoram a aumentar, estando mais presentes entre heterozigotos e, portanto, não sendo favoravelmente selecionadas. Contudo, a partir de um determinado ponto (*tipping point*) a quantidade de homozigotos passa a ser suficiente para fazer com que a frequência da mutação suba muito rapidamente, sob pressão de seleção com o inseticida. Tais evidências têm sido notadas para populações de naturais de *A. aegypti* (García et al. 2009; Saavedra-Rodriguez et al. 2012), bem como em experimentos de pressão de seleção em laboratório, onde, por exemplo, se atingiu a fixação de mutações *kdr* após apenas cinco gerações (Saavedra-Rodriguez et al. 2012).

A interrupção de fato do uso de PY tende a levar à diminuição na frequência de mutações *kdr*, como acima discutido. Por outro lado, se o inseticida continua sendo aplicado, pode-se haver seleção para um “amelioramento” dos efeitos pleiotrópicos da resistência, ou seja, diminuindo ou mesmo neutralizando seus efeitos negativos – seleção dos chamados “genes modificadores” (Belinato & Martins 2016). Com isto a frequência dos alelos *kdr* se manteria alta mesmo em ambientes livres do PY. Desta forma, será interessante observar a dinâmica dos alelos *kdr* em *A. aegypti*, que se encontram já em frequências muito altas, e em *A. albopictus*, cuja dispersão parece estar no início.

Para otimização de um controle químico efetivo do vetor, além do conhecimento a cerca dos mecanismos selecionados para a resistência a inseticidas é importante também conhecer sua estruturação genética. Principalmente ao se considerar novas estratégias, como mosquitos transgênicos (Carvalho et al. 2015) e liberação de linhagem de *A. aegypti* portadora de *Wolbachia* (Dutra et al. 2015).

Há consideravelmente maior diversidade entre as populações de *Aaa* fora da África do que as *Aaf*, o que pode ser entendido pelo fato daquelas populações terem sido recentemente fundadas e estarem em expansão em habitats descontínuos (Gloria-Soria et al. 2016). Embora seja provável que *Aaa* tenha chegado pela primeira vez na Ásia mais tarde (final do século XIX) do que nas Américas (séculos XVI a XVIII), as populações asiáticas são mais homogêneas. Contudo, é importante considerar que as condições de transporte (ferrovias, estradas, aeroviárias) estavam muito mais desenvolvidas no século XIX, facilitando a dispersão passiva do vetor no continente asiático (Powell & Tabachnick 2013). Além disso, em meados do século XX houveram vários eventos de eliminação e re-introdução de *A. aegypti* no continente americano (Monteiro et al. 2014).

O gene *Na_v* é altamente conservado entre diferentes espécies de insetos. Previamente havia sido observada uma alta diferenciação no íntron entre os exons 20 e 21 (segmento IIS6) em populações brasileiras de *A. aegypti*. Baseando-se nesta diferença, as sequências foram agrupadas em dois grupos: A (com ‘íntron maior’) e B (‘íntron menor’) (Martins et al. 2009a). As sequências obtidas no presente trabalho confirmaram esta diferenciação e, adicionadas a sequências de diversas localidades do mundo (Kawada et al. 2016), mantem-se a divisão em dois clados. Sugere-se que se

trate de um polimorfismo antigo, provavelmente anterior à expansão de *Aaa* para Américas e Ásia. Desta forma, ambos os tipos de sequências do *Nav* (A e B ou clados 1 e 2) estão presentes em populações americanas, asiáticas e africanas (Kawada et al. 2016). A relação entre estas sequências, o surgimento e expansão das mutações *kdr* e suas relações com a resistência a PY precisam ser entendidos de forma mais concreta.

Os trabalhos mais recentes de genética de populações usando microssatélites em 11 populações amplamente distribuídas de *A. aegypti* do Brasil (Monteiro et al. 2014), assim como algumas populações da região Andina da Colômbia usando DNA mitocondrial como marcador molecular (Aguirre-Obando et al. 2015), apresentam uma estruturação genética e a formação de dois clados. No Brasil, os dois grupos observados se encaixam adequadamente com a distribuição dos alelos *kdr*: Nav^{R1} mais ao Norte/Nordeste, com baixa ou nula frequência de Nav^{R2} , e alta frequência desta mais ao Sul/Sudeste (Monteiro et al. 2014). As populações de *A. aegypti* colombianas, brasileiras, assim como de outros locais das Américas são relatadas como populações geneticamente estruturadas, com alto fluxo gênico e, substancialmente interconectadas (Gloria-Soria et al. 2016; Gonçalves et al. 2012). Essas conexões resultam da dispersão passiva de *A. aegypti* entre diferentes países, sendo a dispersão passiva do vetor o padrão mais comum globalmente (Paupy et al. 2012). Portanto, os alelos *kdr* Nav^{R1} e Nav^{R2} detectados na Colômbia e Brasil poderiam estar se deslocando desde um país para outro.

Desde uma perspectiva de saúde pública brasileira, Foz do Iguaçu, uma cidade na área da tríplice fronteira, com uma intensa atividade econômica é um ponto estratégico para o programa de controle vetorial brasileiro. Nesta municipalidade, um trabalho prévio de genética de populações por estratos na área urbana, mostrou que as populações de *A. aegypti* apresentavam um alto fluxo genético entre os estratos que compõem a cidade (Bona et al. 2012). Portanto, não deve haver barreiras dentro da própria cidade que dificultem a disseminação de novas variedades genéticas, incluindo genes de resistência a inseticidas e competência vetorial, por exemplo, vindas dos outros países com que faz fronteira. Da mesma forma, variedades vindas do norte do país poderiam se estabelecer na cidade e passarem para os países vizinhos.

Do ponto de vista dos programas de controle vetorial para ambos os países, a presença de mutações *kdr* em *A. aegypti* e *A. albopictus*, principalmente nesta última

espécie devido à falta de informações em geral, pode ter consequências graves para o uso sustentável dos PY, uma vez que em *A. albopictus* o alelo *kdr* 1534Cys poderia rapidamente se fixar após o uso intensivo de PY. Embora, *A. albopictus* ser considerado um vetor da dengue menos eficiente em comparação com *A. aegypti* (Lambrechts et al. 2010), o tigre-asiático tem desempenhado um papel significativo nos surtos de Zika na África Central (Grard et al. 2014) e de chikungunya na África Central, Ásia e Europa (de Alencar et al. 2008; Dubrulle et al. 2009; Ravi 2006; Vazeille et al. 2011). Nas Américas, *A. albopictus* ainda não tem sido vinculado à transmissão dos vírus da dengue, chikungunya e Zika. No entanto, essa espécie é considerada um potencial vetor nas Américas devido à alta competência vetorial das populações locais para essas arbovíroses (Ibáñez-Bernal et al. 1997; Mendez et al. 2006). Portanto, seria prudente incluir o *A. albopictus* no programa de controle vetorial.

Além disso, as frequências para o alelo *kdr* 1534Cys em *A. albopictus* poderiam ser subestimadas, já que, as metodologias utilizadas para avaliar as medidas de controle são baseados em estratégias para *A. aegypti*. No Brasil, os dados relativos à rede MoReNAa são baseados em duas metodologias: o índice larval (LI) e o método de Levantamento Rápido do Índice de Infestação de *A. aegypti* (LIRAA). LI e LIRAA são utilizados para detectar as formas imaturas de mosquitos, o índice mais tradicional para *Aedes*. Adicionalmente, o LIRAA, também é utilizado para dividir os municípios em estratos (edifícios residenciais ou comerciais), dependendo da densidade da população do município, o que permite determinar a forma como a amostragem será realizada (Braga & Valle 2007c). No entanto, ambas as estratégias são empregadas na área urbana, aonde o *A. aegypti* é preferencialmente encontrado. Apesar disso, *A. albopictus* prefere habitats com mais vegetação e é geralmente mais exofílico que *A. aegypti* (Kraemer et al. 2015b). Neste contexto, amostragens em ovitrampas não podem cobrir alguns ambientes onde *A. albopictus* é mais comum, como foi observado aqui.

No Brasil, a mais recente e ampla pesquisa nacional sobre a distribuição de *A. albopictus*, usando os índices larvais anuais desde 2007 até 2014 por ambas LI e LIRAA, mostrou que o índice de infestação predial (HI) para *A. aegypti* é tradicionalmente maior do que os detectados em *A. albopictus*. No entanto, desde 2007 a 2011, em 34 municípios brasileiros das regiões Norte (5), Noroeste (2), Sul (4) e Sudeste (23), os valores da relação do HI para *A. albopictus* (variando de 0,1 (Norte) a 40 (Sudeste); mediana: 1,4) foram superiores aos de *A. aegypti* (Carvalho et al. 2014).

Nossos resultados indicam a presença de mutações *kdr* relacionadas à resistência aos PY em populações naturais de *A. aegypti*, o principal vetor da dengue, chikungunya e Zika, e *A. albopictus*, o vetor potencial dessas arbovírus, em varias localidades da Colômbia e Brasil. Estes resultados sugerem fortemente a necessidade de uma utilização integrada apropriado dos inseticidas utilizados em ambos os países, assinalando a necessidade da inclusão nos programas de controle vetorial do *A. albopictus*, o potencial vetor dos três arbovírus.

7. CONCLUSÕES

✓ Nas populações de *A. aegypti* e *A. albopictus* foram clonados e sequenciados os segmentos IIS6 e IIS6 do Nav, encontrado para as populações de *A. aegypti* da Colômbia e Brasil as mutações Ile1011Met, Val1016Ile (IIS6) e Phe1534Cys (IIS6), enquanto que nas populações do tigre-asiático do Brasil, somente foi evidenciada a mutação Phe1534Cys (IIS6) nos Estados de Paraná e Rondônia;

✓ Em todas as populações de *A. aegypti* analisadas foram detectados os alelos *kdr* Nav^{R1} e Nav^{R2}. No entanto, nas populações da Colômbia o alelo Nav^{R1} foi mais frequente que o Nav^{R2}. Embora no Brasil o alelo Nav^{R1} também esteja espalhado em todas as populações, o alelo *kdr* Nav^{R2} foi mais frequente nas localidades da região Sul e Centro-Oeste, bem como em algumas populações de mosquitos da região Norte.

✓ Em Foz do Iguaçu, com exceção do estrato um, o alelo *kdr* Nav^{R2} está homogeneamente distribuído ao longo da área urbana em frequências $\geq 55\%$;

✓ Nas populações de *A. albopictus* do Brasil, com exceção de Rondonópolis (Estado de Mato Grosso), o alelo 1534Cys^{*kdr*} esta presente e distribuído nas cidades dos Estados do Paraná (até 10%) e Rondônia (3%).

8. REFERÊNCIAS

- Aguir M, Stollenwerk N, Halstead S 2016. The risks behind Dengvaxia recommendation. *The Lancet Infectious Diseases*, 16, 882.
- Aguirre-Obando O, Dalla Bonna A, Duque Luna J, Navarro-Silva M 2015. Insecticide resistance and genetic variability in natural populations of *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera: Culicidae) from Colombia. *Zoologia (Curitiba)*, 32, 14-22.
- Aguirre-Obando OA, Pietrobon AJ, Dalla Bona AC, Navarro-Silva MA 2016. Contrasting patterns of insecticide resistance and knockdown resistance (kdr) in *Aedes aegypti* populations from Jacarezinho (Brazil) after a Dengue Outbreak. *Revista Brasileira de Entomologia*, In press, 7.
- Aliota MT, Walker EC, Yepes AU, Velez ID, Christensen BM, Osorio JE 2016. The wMel Strain of *Wolbachia* Reduces Transmission of Chikungunya Virus in *Aedes aegypti*. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 10, e0004677.
- Alvarez LC, Ponce G, Saavedra-Rodriguez K, Lopez B, Flores AE 2015. Frequency of V1016I and F1534C mutations in the voltage-gated sodium channel gene in *Aedes aegypti* in Venezuela. *Pest Management Science*, 71, 863-869.
- Atencia MC, de Jesús Pérez M, Jaramillo MC, Caldera SM, Cocherro S, Bejarano EE 2016. Primer reporte de la mutación F1534C, asociada con resistencia cruzada a DDT y piretroides, en *Aedes aegypti* de Colombia. *Biomédica*, 36.
- Azevedo R, Oliveira C, Vasconcelos P 2015. Chikungunya risk for Brazil. *Rev. Saude Publica*, 49, 1-6.
- Bagny L, Delatte H, Elissa N, Quilici S, Fontenille D 2009. *Aedes* (Diptera: Culicidae) vectors of arboviruses in Mayotte (Indian Ocean): distribution area and larval habitats. *J. Med. Entomol.*, 46, 198-207.
- Baldacchino F, Caputo B, Chandre F, Drago A, della Torre A, Montarsi F, Rizzoli A 2015. Control methods against invasive *Aedes* mosquitoes in Europe: a review. *Pest Management Science*, 1-38.
- Belinato T, Martins A 2016. Insecticide Resistance and Fitness Cost. In S Trdan, *Insecticides Resistance*, INTECH, Slovenia, p. 243-261.
- Bellinato DF, Viana-Medeiros PF, Araújo SC, Martins AJ, Lima JBP, Valle D 2016. Resistance Status to the Insecticides Temephos, Deltamethrin, and Diflubenzuron in Brazilian *Aedes aegypti* Populations. *BioMed Research International*, 2016, 12.
- Bona ACD, Piccoli CF, Leandro AdS, Kafka R, Twerdochilib AL, Navarro-Silva MA 2012. Genetic profile and molecular resistance of *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera: Culicidae) in Foz do Iguaçu (Brazil), at the border with Argentina and Paraguay. *Zoologia (Curitiba)*, 29, 540-548.

- Bonizzoni M, Gasperi G, Chen X, James AA 2013. The invasive mosquito species *Aedes albopictus*: current knowledge and future perspectives. *Trends in Parasitology*, 29, 460-468.
- Boshell J, Groot H, Gacharna M, Márquez G, González M, Gaitán M, Berlie C, Martínez M 1986. Dengue en Colombia. *Biomédica*, 6, 101-106.
- Brady O, Golding N, Pigott D, Kraemer M, Messina J, Reiner Jr R, Scott T, Smith D, Gething P, Hay S 2014. Global temperature constraints on *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* persistence and competence for dengue virus transmission. *Parasites and Vectors*, 7, 338.
- Brady O, Johansson M, Guerra C, Bhatt S, Golding N, Pigott D, Delatte H, Grech M, Leisnham P, Maciel-de-Freitas R 2013. Modelling adult *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* survival at different temperatures in laboratory and field settings. *Parasites & vectors*, 6, 351.
- Brady OJ, Gething PW, Bhatt S, Messina JP, Brownstein JS, Hoen AG, Moyes CL, Farlow AW, Scott TW, Hay SI 2012. Refining the global spatial limits of dengue virus transmission by evidence-based consensus. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 6, e1760.
- Braga I, Lima J, Soares S, Valle D 2004. *Aedes aegypti* resistance to temephos during 2001 in several municipalities in the states of Rio de Janeiro, Sergipe, and Alagoas, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 99, 199-203.
- Braga I, Valle D 2007a. *Aedes aegypti*: histórico do controle no Brasil. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, 16, 113-118.
- Braga I, Valle D 2007b. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. *Epidemiol. Serv. Saúde*, 16, 279-293.
- 2007c. *Aedes aegypti*: vigilância, monitoramento da resistência e alternativas de controle no Brasil. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, 16, 295-302.
- Braks M, Honório N, Lounibos L, Lourenço-de-Oliveira R, Juliano S 2004. Interspecific competition between two invasive species of container mosquitoes, *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae), in Brazil. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 97, 130-139.
- Brasil P, Sequeira PC, Freitas ADA, Zogbi HE, Calvet GA, de Souza RV, Siqueira AM, de Mendonca MCL, Nogueira RMR, de Filippis AMB 2016. Guillain-Barré syndrome associated with Zika virus infection. *The Lancet*, 387, 1482.
- Bregues C, Hawkes N, Chandre F, McCarroll L, Duchon S, Guillet P, Manguin S, Morgan J, Hemingway J 2003. Pyrethroid and DDT cross-resistance in *Aedes aegypti* is correlated with novel mutations in the voltage-gated sodium channel gene. *Med. Vet. Entomol.*, 17, 87-94.

- Brito L, Linss J, Lima-Camara T, Belinato T, Peixoto A, Lima J, Valle D, Martins A 2013. Assessing the effects of *Aedes aegypti* kdr mutations on pyrethroid resistance and its fitness cost. *PLoS One*, 8, e60878.
- Brown A 1986. INSECTICIDE RESISTANCE IN MOSQUITOES: A PRAGMATIC REVIEW. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, 2, 123-140.
- Brown J, Evans B, Zheng W, Obas V, Barrera-Martinez L, Egizi A, Zhao H, Caccone A, Powell J 2014. Human impacts have shaped historical and recent evolution in *Aedes aegypti*, the dengue and yellow fever mosquito. *Evolution*, 68, 514-525.
- Brown JE, McBride CS, Johnson P, Ritchie S, Paupy C, Bossin H, Lutomiah J, Fernandez-Salas I, Ponlawat A, Cornel AJ 2011. Worldwide patterns of genetic differentiation imply multiple ‘domestications’ of *Aedes aegypti*, a major vector of human diseases. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 278, 2446-2454.
- Cao-Lormeau V-M, Blake A, Mons S, Lastère S, Roche C, Vanhomwegen J, Dub T, Baudouin L, Teissier A, Larre P 2016. Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. *The Lancet*, 387, 1531-1539.
- Cao-Lormeau V-M, Musso D 2014. Emerging arboviruses in the Pacific. *The Lancet*, 384, 1571-1572.
- Cardoso C, Paploski I, Kikuti M, Rodrigues M, Silva M, Campos G, Sardi S, Kitron U, Reis M, Ribeiro G 2015. Outbreak of Exanthematous Illness Associated with Zika, Chikungunya, and Dengue Viruses, Salvador, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.*, 21, 2274-2276.
- Carvalho D, McKemey A, Garziera L, Lacroix R, Donnelly C, Alphey L, Malavasi A, Capurro M 2015. Suppression of a field population of *Aedes aegypti* in Brazil by Sustained Release of Transgenic Male Mosquitoes. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 9, e0003864.
- Carvalho RG, Lourenço-de-Oliveira R, Braga IA 2014. Updating the geographical distribution and frequency of *Aedes albopictus* in Brazil with remarks regarding its range in the Americas. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 109, 787-796.
- Castrillón JC, Castaño JC, Urcuqui S 2015. Dengue en Colombia: diez años de evolución. *Rev. Chilena Infectol.*, 32, 142-149.
- Catterall W 2000. From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron*, 26, 13-25.
- Conde M, Orjuela L, Castellanos C, Herrera-Varela M, Licastro S, Quiñones M 2015. Evaluación de la sensibilidad a insecticidas en poblaciones de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) del departamento de Caldas, Colombia, en 2007 y 2011. *Biomédica*, 35, 43-52.

- Cui F, Raymond M, Qiao C-L 2006. Insecticide resistance in vector mosquitoes in China. *Pest Management Science*, 62, 1013-1022.
- Chang C, Shen W, Wang T, Lin Y, Hsu E, Dai S 2009. A novel amino acid substitution in a voltage-gated sodium channel is associated with knockdown resistance to permethrin in *Aedes aegypti*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 39, 272-278.
- Chapadense F, Fernandes E, Lima J, Martins A, Silva L, Rocha W, Santos A, Cravo P 2015. Phenotypic and genotypic profile of pyrethroid resistance in populations of the mosquito *Aedes aegypti* from Goiânia, Central West Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 48, 607-609.
- Charrel RN, de Lamballerie X, Raoult D 2007. Chikungunya outbreaks-the globalization of vectorborne diseases. *N. Engl. J. Med.*, 356, 769.
- Chen H, Li K, Wang X, Yang X, Lin Y, Cai F, Zhong W, Lin C, Lin Z, Ma Y 2016. First identification of kdr allele F1534S in VGSC gene and its association with resistance to pyrethroid insecticides in *Aedes albopictus* populations from Haikou City, Hainan Island, China. *Infectious Diseases of Poverty*, 5, 8.
- Chouin-Carneiro T, Vega-Rua A, Vazeille M, Yebakima A, Girod R, Goindin D, Dupont-Rouzeyrol M, Lourenço-de-Oliveira R, Failloux A-B 2016. Differential Susceptibilities of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from the Americas to Zika Virus. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 10, e0004543.
- Christofferson RC 2016. Zika virus emergence and expansion: lessons learned from dengue and chikungunya may not provide all the answers. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 95, 15-0866.
- Da-Cunha MP, Lima JBP, Brogdon WG, Moya GE, Valle D 2005. Monitoring of resistance to the pyrethroid cypermethrin in Brazilian *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations collected between 2001 and 2003. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 100, 441-444.
- Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE): Estadísticas por tema Demografía y población [homepage on the Internet], Bogotá: Departamento Administrativo Nacional de Estadística DANE; 2016. Available from: <http://www.dane.gov.co/index.php/estadisticas-por-tema/demografia-y-poblacion>.
- Darriba D, Taboada G, Doallo R, Posada D 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature methods*, 9, 772-772.
- de Alencar CHM, de Albuquerque LM, de Aquino TMF, Soares CB, Ramos Júnior AN, Lima JWdO, Pontes RJS 2008. POTENCIALIDADES DO *AEDES ALBOPICTUS* GOMO VETOR DE ARBOVIROSES NO BRASIL: UM DESAFIO PARA A ATENÇÃO PRIMÁRIA. *Revista de Atencao Primaria a Saude*, 11.
- Dick G, Kitchen S, Haddow A 1952. Zika virus (I). Isolations and serological specificity. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 46, 509-520.

Dick OB, San Martín JL, Montoya RH, del Diego J, Zambrano B, Dayan GH 2012. The history of dengue outbreaks in the Americas. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 87, 584-593.

DOLINŠEK J, KOVAČ M, ZEL J, CAMLOH M 2007. PYRETHRUM (TANACETUM CINERARIIFOLIUM) FROM THE NORTHERN ADRIATIC AS A POTENTIAL SOURCE OF NATURAL INSECTICIDE. *Annales Ser. Hist. Nat.*, 17.

Dong K, Du Y, Rinkevich F, Nomura Y, Xu P, Wang L, Silver K, Zhorov BS 2014. Molecular biology of insect sodium channels and pyrethroid resistance. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 50, 1-17.

Donnelly MJ, Isaacs AT, Weetman D 2016. Identification, validation, and application of molecular diagnostics for insecticide resistance in malaria vectors. *Trends in Parasitology*, 32, 197-206.

Du Y, Nomura Y, Satar G, Hu Z, Nauen R, He SY, Zhorov BS, Dong K 2013. Molecular evidence for dual pyrethroid-receptor sites on a mosquito sodium channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110, 11785-11790.

Du Y, Nomura Y, Zhorov BS, Dong K 2015. Evidence for dual binding sites for DDT in Insect Sodium Channels. *J. Biol. Chem.*, jbc. M115. 678672.

Dubrulle M, Mousson L, Moutailler S, Vazeille M, Failloux A-B 2009. Chikungunya virus and *Aedes* mosquitoes: saliva is infectious as soon as two days after oral infection. *PLoS One*, 4, e5895.

Duffy MR, Chen T-H, Hancock WT, Powers AM, Kool JL, Lanciotti RS, Pretrick M, Marfel M, Holzbauer S, Dubray C 2009. Zika virus outbreak on Yap Island, federated states of Micronesia. *N. Engl. J. Med.*, 360, 2536-2543.

Duque J, da Silva RV, Kuwabara EF, Navarro-Silva MA 2010. Dengue no Estado do Paraná, Brasil: distribuição temporal e espacial no período 1995-2007. *Revista de la Universidad Industrial de Santander. Salud*, 42, 113-122.

Dusfour I, Zorrilla P, Guidez A, Issaly J, Girod R, Guillaumot L, Robello C, Strode C 2015. Deltamethrin Resistance Mechanisms in *Aedes aegypti* Populations from Three French Overseas Territories Worldwide. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 9, e0004226.

Dutra H, Dos Santos L, Caragata EP, Silva J, Villela D, Maciel-de-Freitas R, Moreira LA, Benedict MQ 2015. From Lab to Field: The Influence of Urban Landscapes on the Invasive Potential of *Wolbachia* in Brazilian *Aedes aegypti* Mosquitoes. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 9, e0003689-e0003689.

Failloux A-B, Vazeille M, Rodhain F 2002. Geographic genetic variation in populations of the dengue virus vector *Aedes aegypti*. *J. Mol. Evol.*, 55, 653-663.

Fay R, Eliason DA 1966. A preferred oviposition site as a surveillance method for *Aedes aegypti*. *Mosq News*, 26, 531-535.

Fonseca-González I, Quiñones ML, Lenhart A, Brogdon WG 2011. Insecticide resistance status of *Aedes aegypti* (L.) from Colombia. *Pest Management Science*, 67, 430-437.

Forattini O 1986. Identificação de *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse) no Brasil. *Rev. Saude Publica*, 20, 244-245.

García GP, Flores AE, Fernández-Salas I, Saavedra-Rodríguez K, Reyes-Solis G, Lozano-Fuentes S, Bond JG, Casas-Martínez M, Ramsey JM, García-Rejón J 2009. Recent rapid rise of a permethrin knock down resistance allele in *Aedes aegypti* in Mexico. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 3, e531.

Gilotra SK, Rozeboom LE, Bhattacharya N 1967. Observations on possible competitive displacement between populations of *Aedes aegypti* Linnaeus and *Aedes albopictus* Skuse in Calcutta. *Bull. World Health Organ.*, 37, 437.

Gloria-Soria A, Ayala D, Bheecarry A, Calderon-Arguedas O, Chadee D, Chiappero M, Coetzee M, Elahee K, Fernandez-Salas I, Kamal H, Kamgang B, Khater E, Kramer L, Kramer V, Lopez-Solis A, Lutomiah J, Martins A, Micieli M, Paupy C, Ponlawat A, Rahola N, Rasheed S, Richardson J, Saleh A, Sanchez-Casas R, Seixas G, Sousa C, Tabachnick WJ, Troyo A, Powell J 2016. Global Genetic Diversity of *Aedes aegypti*. *Mol. Ecol.*

Gonçalves A, Cunha I, Santos W, Luz S, Ribolla P, Abad-Franch F 2012. Gene flow networks among American *Aedes aegypti* populations. *Evolutionary applications*, 5, 664-676.

Gonzalez PV, Audino PA, Masuh HM 2016. Oviposition Behavior in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Response to the Presence of Heterospecific and Conspecific Larvae. *J. Med. Entomol.*, 53, 268-272.

Grard G, Caron M, Mombo I, Nkoghe D, Ondo S, Jiolle D, Fontenille D, Paupy C, Leroy EM 2014. Zika virus in Gabon (Central Africa)–2007: A new threat from *Aedes albopictus*? *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 8, e2681.

Halstead S, Aguiar M 2016. Dengue vaccines: Are they safe for travelers? *Travel Med. Infect. Dis.*, 14, 378-383.

Harris A, Rajatileka S, Ranson H 2010. Pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* from Grand Cayman. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 83, 277-284.

Hartl D, Clark A 2010. *Princípios de genética de populações*. 4th ed., 4th ed., ARTMED Editora S.A, Porto Alegre.

Hayes E 2009. Zika virus outside Africa. *Emerg. Infect. Dis.*, 15, 1347-1350.

Heinen L, Zuchi N, Cardoso B, Santos M, Nogueira Ma, Dezengrini-Slhessarenko R 2015. DENGUE OUTBREAK IN MATO GROSSO STATE, MIDWESTERN BRAZIL. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, 57, 489-496.

Hemingway J, Hawkes N, McCarroll L, Ranson H 2004. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 34, 653-665.

Higgs S, Vanlandingham DL 2015. Chikungunya: here today, where tomorrow? *International Health*, 7, 1-3.

Hladish T, Pearson C, Chao D, Rojas D, Recchia G, Gómez-Dantés H, Halloran ME, Pulliam J, Longini I 2016. Projected Impact of Dengue Vaccination in Yucatán, Mexico. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 10, e0004661.

Ibanez-Bernal S, Martinez-Campos C 1994. *Aedes albopictus* in Mexico. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, 10, 231-232.

Ibáñez-Bernal S, Briseno B, Mutebi JP, Argot E, Rodriguez G, Martinez-Campos C, Paz R, Román PDLF-S, Tapia-Conyer R, Flisser A 1997. First record in America of *Aedes albopictus* naturally infected with dengue virus during the 1995 outbreak at Reynosa, Mexico. *Med. Vet. Entomol.*, 11, 305-309.

Histórico do Foz do Iguaçu [homepage on the Internet], Brasil: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE); 2013. Available from: [http://ibge.gov.br/cidadesat/painel/historico.php?lang=&codmun=410830&search=para na|foz-do-iguacu|infograficos:-historico](http://ibge.gov.br/cidadesat/painel/historico.php?lang=&codmun=410830&search=para%20foz-do-iguacu%20infograficos%20-historico).

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE): Divisão Regional [homepage on the Internet], Brasília: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE); 2016. Available from: http://www.ibge.gov.br/home/geociencias/geografia/default_div_int.shtm?c=1.

Boletín epidemiológico semanal: Semana epidemiológica número 25 de 2015 [homepage on the Internet], Bogotá: Instituto Nacional de Salud; 2015a. Available from: <http://www.ins.gov.co/boletin-epidemiologico/Paginas/default.aspx>.

Semana epidemiológica número 45 de 2015 (08 nov. al 14 nov.) [homepage on the Internet], Bogotá: Instituto Nacional de Salud (INS); 2015b. Available from: <http://www.ins.gov.co/boletin-epidemiologico/Boletn%20Epidemiolgico/2015%20Boletin%20epidemiologico%20semana%2045.pdf>.

Boletín Epidemiológico semanal [homepage on the Internet], Bogotá: Instituto Nacional de Salud -INS; 2016a. Available from: <http://www.ins.gov.co/boletin-epidemiologico/Boletn%20Epidemiolgico/2016%20Bolet%C3%ADn%20epidemiol%C3%B3gico%20semana%2021.pdf>.

Instituto Nacional de Salud [homepage on the Internet], Bogotá: Ministerio de Salud y Protección Social; 2016b. Available from: <http://www.ins.gov.co/Paginas/inicio.aspx>.
IRAC 2011. Prevention and Management of Insecticide Resistance in Vectors of Public Health Importance. In, Second Edition ed., Insecticide Resistance Action Committee (IRAC).

- Ishak IH, Jaal Z, Ranson H, Wondji CS 2015a. Contrasting patterns of insecticide resistance and knockdown resistance (kdr) in the dengue vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from Malaysia. *Parasites & Vectors*, 8, 181.
- Ishak IH, Jaal Z, Ranson H, Wondji CS 2015b. Contrasting patterns of insecticide resistance and knockdown resistance (kdr) in the dengue vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from Malaysia. *Parasit Vectors*, 8, 181.
- Jones C, Liyanapathirana M, Agossa F, Weetman D, Ranson H, Donnelly M, Wilding C 2012. Footprints of positive selection associated with a mutation (N1575Y) in the voltage-gated sodium channel of *Anopheles gambiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109, 6614-6619.
- Juliano SA, Lounibos LP, O'Meara GF 2004. A field test for competitive effects of *Aedes albopictus* on *A. aegypti* in South Florida: differences between sites of coexistence and exclusion? *Oecologia*, 139, 583-593.
- Kantor I 2016. Dengue, Zika and Chikungunya. *Medicina*, 76, 93.
- Kasai S, Komagata O, Itokawa K, Shono T, Ng LC, Kobayashi M, Tomita T 2014. Mechanisms of pyrethroid resistance in the dengue mosquito vector, *Aedes aegypti*: target site insensitivity, penetration, and metabolism. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 8, e2948.
- Kasai S, Ng LC, Lam-Phua SG, Tang CS, Itokawa K, Komagata O, Kobayashi M, Tomita T 2011. First detection of a putative knockdown resistance gene in major mosquito vector, *Aedes albopictus*. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 64, 217-221.
- Kawada H, Higa Y, Futami K, Muranami Y, Kawashima E, Osei J, Sakyi K, Dadzie S, de Souza D, Appawu M 2016. Discovery of Point Mutations in the Voltage-Gated Sodium Channel from African *Aedes aegypti* Populations: Potential Phylogenetic Reasons for Gene Introgression. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 10, e0004780.
- Kawada H, Higa Y, Komagata O, Kasai S, Tomita T, Yen NT, Loan LL, Sánchez R, Takagi M 2009a. Widespread distribution of a newly found point mutation in voltage-gated sodium channel in pyrethroid-resistant *Aedes aegypti* populations in Vietnam. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 3, e527.
- Kawada H, Higa Y, Nguyen YT, Tran SH, Nguyen HT, Takagi M 2009b. Nationwide investigation of the pyrethroid susceptibility of mosquito larvae collected from used tires in Vietnam. *PLoS Negl Trop Dis*, 3, e391.
- Kawada H, Oo SZM, Thaung S, Kawashima E, Maung YNM, Thu HM, Thant KZ, Minakawa N 2014. Co-occurrence of point mutations in the voltage-gated sodium channel of pyrethroid-resistant *Aedes aegypti* populations in Myanmar. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 8, e3032.
- Kraemer MU, Sinka ME, Duda KA, Mylne A, Shearer FM, Brady OJ, Messina JP, Barker CM, Moore CG, Carvalho RG 2015a. The global compendium of *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* occurrence. *Scientific Data*, 2, 150035.

- Kraemer MU, Sinka ME, Duda KA, Mylne AQ, Shearer FM, Barker CM, Moore CG, Carvalho RG, Coelho GE, Van Bortel W 2015b. The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. *Elife*, 4, e08347.
- Kuno G 2010. Early history of laboratory breeding of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) focusing on the origins and use of selected strains. *J. Med. Entomol.*, 47, 957-971.
- Kushwah R, Mallick P, Ravikumar H, Dev V, Kapoor N, Adak T, Singh O 2015a. Status of DDT and pyrethroid resistance in Indian *Aedes albopictus* and absence of knockdown resistance (kdr) mutation. *J. Vector Borne Dis.*, 52, 95-98.
- Kushwah RBS, Dykes CL, Kapoor N, Adak T, Singh OP 2015b. Pyrethroid-Resistance and Presence of Two Knockdown Resistance (kdr) Mutations, F1534C and a Novel Mutation T1520I, in Indian *Aedes aegypti*. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 9, e3332.
- Laiton-Donato K, Usme-Ciro JA, Rico A, Pardo L, Martínez C, Salas D, Ardila S, Páez A 2016. Análisis filogenético del virus Chikungunya en Colombia: evidencia de selección purificadora sobre el gen E1. *Biomédica*, 36.
- Lambkin C, Sinclair B, Pape T, Courtney G, Skevington J, Meier R, Yeates D, Blagoderov V, Wiegmann B 2013. The phylogenetic relationships among infraorders and superfamilies of Diptera based on morphological evidence. *Systematic Entomology*, 38, 164-179.
- Lambrechts L, Scott TW, Gubler DJ 2010. Consequences of the expanding global distribution of *Aedes albopictus* for dengue virus transmission. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 4, e646.
- Lima EP, Paiva M, de Araújo AP, Da Silva E, da Silva UM, de Oliveira LN, Santana A, Barbosa CN, de Paiva Neto CC, Goulart M 2011. Insecticide resistance in *Aedes aegypti* populations from Ceará, Brazil. *Parasit Vectors*, 4, 2-12.
- Linss JG, Brito L, Garcia G, Araki A, Bruno R, Lima JB, Valle D, Martins A 2014. Distribution and dissemination of the Val1016Ile and Phe1534Cys Kdr mutations in *Aedes aegypti* Brazilian natural populations. *Parasit Vectors*, 7, 25.
- Lounibos LP 2002. Invasions by insect vectors of human disease. *Annu. Rev. Entomol.*, 47, 233-266.
- Lucena LTd, Aguiar LO, Bogoevich ACA, Azevedo FSd, Santos ACPd, Vale DBAPd, Pereira DB, Villalobos-Salcedo JM 2011. Dengue na Amazônia: aspectos epidemiológicos no Estado de Rondônia, Brasil, de 1999 a 2010. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, 2, 19-25.
- Macoris M, Camargo M, Silva I, Takaku L, Andrighetti M 1995. Modificação da suscetibilidade de *Aedes (Stegomyia) aegypti* ao temephos. *Revista de Patologia Tropical*, 24, 31-40.

Maestre-Serrano R, Gomez-Camargo D, Ponce-Garcia G, Flores AE 2014. Susceptibility to insecticides and resistance mechanisms in *Aedes aegypti* from the Colombian Caribbean Region. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 116, 63-73.

Maestre R 2012. *Susceptibility Status of Aedes aegypti to Insecticides in Colombia*. InTech Press, Croatia.

Marcombe S, Farajollahi A, Healy SP, Clark GG, Fonseca DM 2014. Insecticide resistance status of United States populations of *Aedes albopictus* and mechanisms involved. *PLoS One*, 9, e101992.

Marcombe S, Mathieu R, Pocquet N, Riaz M, Poupardin R, Sélis S, Darriet F, Reynaud S, Yébakima A, Corbel V 2012. Insecticide resistance in the dengue vector *Aedes aegypti* from Martinique: distribution, mechanisms and relations with environmental factors. *PLoS One*, 7, e30989.

Marquetti M, Bisset J, Leyva M, García A, Rodríguez M 2008. Comportamiento estacional y temporal de *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* en La Habana, Cuba. *Rev. Cubana Med. Trop.*, 60, 62-67.

Notes from the field: evidence of Zika virus infection in brain and placental tissues from two congenitally infected newborns and two fetal losses—Brazil, 2015 [homepage on the Internet], Atlanta: CDC; 2016. MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report; [159-160 screens]. Available from: <http://espanol.cdc.gov/enes/mmwr/volumes/65/wr/mm6506e1.htm>.

Martins A, Brito L, Linss J, da Silva Rivas G, Machado R, Bruno R, Lima J, Valle D, Peixoto A 2013. Evidence for gene duplication in the voltage-gated sodium channel gene of *Aedes aegypti*. *Evolution, Medicine, and Public Health*, 2013, 148-160.

Martins AJ, de Andrade Lins R, Linss JG, Peixoto AA, Valle D 2009a. Voltage-gated sodium channel polymorphism and metabolic resistance in pyrethroid-resistant *Aedes aegypti* from Brazil. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 81, 108-115.

Martins AJ, Lima JBP, Peixoto AA, Valle D 2009b. Frequency of Val1016Ile mutation in the voltage-gated sodium channel gene of *Aedes aegypti* Brazilian populations. *Trop. Med. Int. Health*, 14, 1351-1355.

Mattingly P 1957. Genetical aspects of the *Aedes aegypti* problem, I. Taxonomy and bionomics. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 51, 392-408.

——— 1967. Taxonomy of *Aedes aegypti* and related species. *Bull. World Health Organ.*, 36, 552.

Mattingly P, Bruce-Chwatt L 1954. Morphology and bionomics of *Aedes* (*Stegomyia*) *pseudoafricanus* Chwatt (Diptera, Culicidae), with some notes on the distribution of the subgenus *Stegomyia* in Africa. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 48, 183-193.

McClelland G 1960. A preliminary study of the genetics of abdominal colour variations in *Aedes aegypti* (L.)(Diptera, Culicidae). *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 54, 305-320.

McMeniman CJ, Lane RV, Cass BN, Fong AW, Sidhu M, Wang Y-F, O'Neill SL 2009. Stable introduction of a life-shortening *Wolbachia* infection into the mosquito *Aedes aegypti*. *Science*, 323, 141-144.

Mendez F, Barreto M, Arias JF, Rengifo G, Munoz J, Burbano ME, Parra B 2006. Human and mosquito infections by dengue viruses during and after epidemics in a dengue-endemic region of Colombia. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 74, 678-683.

Mendonça F, Dutra D 2009. Saúde pública, urbanização e dengue no Brasil. *Sociedade & Natureza*, 21, 257-269.

Messina JP, Brady OJ, Scott TW, Zou C, Pigott DM, Duda KA, Bhatt S, Katzelnick L, Howes RE, Battle KE 2014. Global spread of dengue virus types: mapping the 70 year history. *Trends Microbiol.*, 22, 138-146.

Ministerio-da-Saúde 2013. LEVANTAMENTO RÁPIDO DE ÍNDICES PARA *AEDES AEGYPTI*– LIRAA – PARA VIGILÂNCIA ENTOMOLÓGICA DO *AEDES AEGYPTI* NO BRASIL: METODOLOGIA PARA AVALIAÇÃO DOS ÍNDICES DE BRETEAU E PREDIAL E TIPO DE RECIPIENTES. In DdVdD Transmissíveis, Primeira ed., Núcleo de Comunicação, Brasília, p. 84.

Boletim epidemiológico 46: 35 [homepage on the Internet], Brasília: Portal da Saúde – Ministério da Saúde; 2015a. Boletim epidemiológico. Available from: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/novembro/24/2015-040.pdf>.

Boletim epidemiológico 46: 42 [homepage on the Internet], Brasília: Portal da Saúde – Ministério da Saúde; 2015b. Boletim epidemiológico. Available from: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/dezembro/11/svs-be-2015-047-dengue-se47-final.pdf>.

Boletim Epidemiológico - Volume 47 - nº 20 - 2016 - Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 16, 2016 [homepage on the Internet], Brasília: Portal da Saúde; 2016a. Portal da Saúde. Available from: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/maio/17/2016-016---Dengue-SE16-publica---o.pdf>.

Incidência de Dengue. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas, 1990 a 2014 [homepage on the Internet]: Ministério da Saúde: Portal da Saúde; 2016b. Available from: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/julho/29/Incid--ncia-dengue-at---2014.pdf>.

INFORME EPIDEMIOLÓGICO Nº 23–SEMANA EPIDEMIOLÓGICA(SE) 16/2016 (17/04A 23/04/2016) MONITORAMENTO DOS CASOS DE MICROCEFALIA NO BRASIL [homepage on the Internet], Brasília: Ministério da Saúde Brasil; 2016c. Available from: http://combateaedes.saude.gov.br/images/sala-de-situacao/informe_microcefalia_epidemiologico23.pdf.

Portal da saúde: Situação Epidemiológica / Dados [homepage on the Internet], Brasília: Ministério da Saúde; 2016d. Available from: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/situacao-epidemiologica-dados-dengue>.

Guía de Vigilancia Entomológica y Control de Dengue [homepage on the Internet], Colombia 2011. Available from: http://new.paho.org/col/index.php?option=com_docman&task=doc_download&gid=1215&Itemid=.

Monteiro F, Shama R, Martins A, Gloria-Soria A, Brown J, Powell J 2014. Genetic Diversity of Brazilian *Aedes aegypti*: Patterns following an Eradication Program. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 8, e3167.

Montella I, Schama R, Valle D 2012. The classification of esterases: an important gene family involved in insecticide resistance-A Review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 107, 437-449.

Montella IR, Martins AJ, Viana-Medeiros PF, Lima JBP, Braga IA, Valle D 2007. Insecticide resistance mechanisms of Brazilian *Aedes aegypti* populations from 2001 to 2004. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 77, 467-477.

Moore CG, Fisher BR 1969. Competition in mosquitoes. Density and species ratio effects on growth, mortality, fecundity, and production of growth retardant. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 62, 1325-1331.

Moore M, Sylla M, Goss L, Burugu MW, Sang R, Kamau LW, Kenya EU, Bosio C, de Lourdes Munoz M, Sharakova M 2013. Dual African Origins of Global *Aedes aegypti* s.l. populations Revealed by Mitochondrial DNA. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 7, e2175.

Motta-Sanchez A, Tonn R, Uribe L, Calheiros L 1976. A comparison of methods of application of several insecticides for the control of *Aedes aegypti* in villages in Colombia. *WHO/VBC*, 76, 1-33.

Moulin E, Selby K, Cherpillod P, Kaiser L, Boillat-Blanco N 2016. Simultaneous outbreaks of dengue, chikungunya and Zika virus infections: diagnosis challenge in a returning traveller with nonspecific febrile illness. *New Microbes and New Infections*, 11, 6-7.

Muñoz LG 2015. Incidencia del dengue en el Quindío durante 1999-2010. *Hospitium*, 2, 16-26.

Musso D, Nilles E, Cao-Lormeau V-M 2014. Rapid spread of emerging Zika virus in the Pacific area. *Clin. Microbiol. Infect.*, 20, O595-O596.

Mustafa M, Rasotgi V, Jain S, Gupta V 2015. Discovery of fifth serotype of dengue virus (DENV-5): A new public health dilemma in dengue control. *Medical Journal Armed Forces India*, 71, 67-70.

Nawrocki S, Hawley W 1987. Estimation of the northern limits of distribution of *Aedes albopictus* in North America. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, 3, 314-317.

Nkya TE, Akhouayri I, Kisinza W, David J-P 2013. Impact of environment on mosquito response to pyrethroid insecticides: facts, evidences and prospects. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 43, 407-416.

Normile D 2013. Surprising new dengue virus throws a spanner in disease control efforts. *Science*, 342, 415-415.

Nunes M, Faria N, de Vasconcelos J, Golding N, Kraemer M, de Oliveira L, da Silva Azevedo R, da Silva D, da Silva E, da Silva S 2015. Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. *BMC Med.*, 13, 1.

Ocampo C, Salazar-Terreros M, Mina N, McAllister J, Brogdon W 2011. Insecticide resistance status of *Aedes aegypti* in 10 localities in Colombia. *Acta Trop.*, 118, 37-44.

Okimoto R, Dodgson J 1996. Improved PCR amplification of multiple specific alleles (PAMSA) using internally mismatched primers. *Biotechniques*, 21, 20-22, 24, 26.

Microcefalia [homepage on the Internet]: OMS; 2016a. OMS. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/microcephaly/es/>.

Síndrome de Guillain–Barré [homepage on the Internet]: OMS; 2016b. OMS. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/guillain-barre-syndrome/es/>.

OPS 1992. El dengue y la fiebre hemorrágica del dengue en las Américas: una visión general del problema. *Boletín Epidemiológico*, 13, 9-10.

——— 1995. *Dengue y dengue hemorrágico en las Américas: guías para su prevención y control*. Organización Panamericana de la Salud, Oficina Sanitaria Panamericana, Oficina Regional de la Organización Mundial de la Salud.

Declaración de la OMS sobre la segunda reunión del Comité de Emergencia del Reglamento Sanitario Internacional (2005) sobre el virus del Zika y el aumento de los trastornos neurológicos y las malformaciones congénitas [homepage on the Internet], Americas: Organización Mundial de la Salud (OMS); 2016. Centro de Prensa.

Pang S, Chiang L, Tan C, Vythilingam I, Lam-Phua S, Ng L 2015. Low efficacy of deltamethrin-treated net against Singapore *Aedes aegypti* is associated with kdr-type resistance. *Tropical Biomedicine*, 32, 140-150.

Paupy C, Le Goff G, Brengues C, Guerra M, Revollo J, Barja Simon Z, Hervé J-P, Fontenille D 2012. Genetic structure and phylogeography of *Aedes aegypti*, the dengue and yellow-fever mosquito vector in Bolivia. *Infect. Genet. Evol.*, 12, 1260-1269.

Petersen LR, Powers AM 2016. Chikungunya: epidemiology. *F1000Research*, 5.

Phuc H, Andreasen M, Burton R, Vass C, Epton M, Pape G, Fu G, Condon K, Scaife S, Donnelly C 2007. Late-acting dominant lethal genetic systems and mosquito control. *BMC Biol.*, 5, 11.

Powell JR, Tabachnick WJ 2013. History of domestication and spread of *Aedes aegypti*-A Review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 108, 11-17.

Prophiro JS, Silva OS, Luna JE, Piccoli CF, Kanis LA, Silva MA 2011a. *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae): coexistence and susceptibility to temephos, in municipalities with occurrence of dengue and differentiated characteristics of urbanization. *Rev Soc Bras Med Trop*, 44, 300-305.

Prophiro JS, Silva OS, Luna JED, Piccoli CF, Kanis LA, Navarro-Silva MA 2011b. *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae): coexistence and susceptibility to temephos, in municipalities with occurrence of dengue and differentiated characteristics of urbanization. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 44, 300-305.

Ranson H, Burhani J, Lumjuan N, Black W 2010. Insecticide resistance in dengue vectors. *TropIKA. net*, 1, 0-0.

Ravi V 2006. Re-emergence of chikungunya virus in India. *Indian J. Med. Microbiol.*, 24, 83.

Ray DE, Fry JR 2006. A reassessment of the neurotoxicity of pyrethroid insecticides. *Pharmacol. Ther.*, 111, 174-193.

Reidenbach K, Cook S, Bertone M, Harbach R, Wiegmann B, Besansky N 2009. Phylogenetic analysis and temporal diversification of mosquitoes (Diptera: Culicidae) based on nuclear genes and morphology. *BMC Evol. Biol.*, 9, 1.

Reinert JF, Harbach RE, Kitching IJ 2009. Phylogeny and classification of tribe *Aedini* (Diptera: Culicidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 157, 700-794.

Rey JR, Lounibos P 2015. Ecología de *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* en América y la transmisión de enfermedades. *Biomédica*, 35.

Rinkevich FD, Du Y, Dong K 2013. Diversity and convergence of sodium channel mutations involved in resistance to pyrethroids. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 106, 93-100.

Rinkevich FD, Du Y, Tolinski J, Ueda A, Wu C-F, Zhorov BS, Dong K 2015. Distinct roles of the DmNa v and DSC1 channels in the action of DDT and pyrethroids. *Neurotoxicology*, 47, 99-106.

Rodriguez-Morales A, Patiño-Valencia S, Villamil-Gómez W, Alvarado-Socarras J, Jimenez-Canizales C 2016a. Situación del Zika en Colombia: experiencia de miembros de la Red Colombiana de Colaboración en Zika (RECOLZIKA). *ACTA MEDICA PERUANA*, 33, 79.

Rodriguez-Morales A, Villamil-Gómez W, Franco-Paredes C 2016b. The arboviral burden of disease caused by co-circulation and co-infection of dengue, chikungunya and Zika in the Americas. *Travel Med. Infect. Dis.*

Rodriguez-Morales AJ 2015. Zika: the new arbovirus threat for Latin America. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 9, 684-685.

- Rodríguez-Morales AJ, Willamil-Gómez WE 2016. El reto de Zika en Colombia y América Latina: Una urgencia sanitaria internacional. *Infectio*, 20, 59-61.
- Rúa-Urbe GL, Suárez-Acosta C, Rojo RA 2012. Implicaciones epidemiológicas de *Aedes albopictus* (Skuse) en Colombia. *Revista Facultad Nacional de Salud Pública*, 30.
- Ruiz-López F, González-Mazo A, Vélez-Mira A, Gómez GF, Zuleta L, Uribe S, Vélez-Bernal ID 2016. Presencia de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) y su infección natural con el virus dengue en alturas no registradas para Colombia. *Biomédica*, 36, 303-308.
- Saavedra-Rodriguez K, Suarez A, Salas I, Strode C, Ranson H, Hemingway J, Black I 2012. Transcription of detoxification genes after permethrin selection in the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Mol. Biol.*, 21, 61-77.
- Saavedra-Rodriguez K, Urdaneta-Marquez L, Rajatileka S, Moulton M, Flores A, Fernandez-Salas I, Bisset J, Rodriguez M, McCall P, Donnelly M 2007. A mutation in the voltage-gated sodium channel gene associated with pyrethroid resistance in Latin American *Aedes aegypti*. *Insect Mol. Biol.*, 16, 785-798.
- Sambrook J, Russell D 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. . In, 3rd Edition ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sánchez N, Rodríguez M, Sarria V 2006. Pesticidas obsoletos en Colombia. Situación actual y alternativas de tratamiento y disposición. *Revista de Ingeniería Facultad de Ingeniería Universidad de los Andes*, Noviembre, 13-22.
- Santacoloma L, Chaves B, Brochero H 2010. Susceptibility of *Aedes aegypti* to DDT, deltamethrin, and lambda-cyhalothrin in Colombia. *Rev. Panam. Salud Publica*, 27, 66-73.
- Saúde MD 2006. Reunião técnica para discutir status de resistência de *Aedes aegyptia* inseticidas. In CGdPNdCdD Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde Brasília.
- Schuffenecker I, Itean I, Michault A, Murri S, Frangeul L, Vaney M-C, Lavenir R, Pardigon N, Reynes J-M, Pettinelli F 2006. Genome microevolution of Chikungunya viruses causing the Indian Ocean outbreak. *PLoS Med.*, 3, e263.
- Schwartz L, Halloran E, Durbin A, Longini I 2015. The dengue vaccine pipeline: Implications for the future of dengue control. *Vaccine*, 33, 3293-3298.
- Simard F, Nchoutpouen E, Toto J, Fontenille D 2005. Geographic distribution and breeding site preference of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Cameroon, Central Africa. *J. Med. Entomol.*, 42, 726-731.
- Simon F, Savini H, Parola P 2008. Chikungunya: a paradigm of emergence and globalization of vector-borne diseases. *Med. Clin. North Am.*, 92, 1323-1343.

Singh O, Dykes C, Das M, Pradhan S, Bhatt R, Agrawal O, Adak T 2010. Research Presence of two alternative kdr-like mutations, L1014F and L1014S, and a novel mutation, V1010L, in the voltage gated Na⁺ channel of *Anopheles culicifacies* from Orissa. *India Malaria Journal*, 9, 10.1186.

Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública -SIVIGILA [homepage on the Internet], Bogotá: Ministerio de Salud y Protección Social; 2016. Available from: <http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/sivigila/Paginas/sivigila.aspx>.

Smith LB, Kasai S, Scott JG 2016. Pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: Important mosquito vectors of human diseases. *Pestic. Biochem. Physiol.*

Snedeker S 2001. Pesticides and breast cancer risk: a review of DDT, DDE, and dieldrin. *Environ. Health Perspect.*, 109, 35-47.

Soderlund D 2012. Molecular mechanisms of pyrethroid insecticide neurotoxicity: recent advances. *Arch. Toxicol.*, 86, 165-181.

Soderlund D, Knipple D 2003. The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 33, 563-577.

Sprenger D, Wuithiranyagool T 1986. The discovery and distribution of *Aedes albopictus* (Skuse) in Harris County, Texas. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, 2, 217-219.

Suárez M, González R, Morales C 1996. Temefos resistance to *Aedes aegypti* in Cali, Colombia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene Supplements*, 55, 257.

Tabachnick W, Wallis G, Aitken T, Miller B, Amato G, Lorenz L, Powell JR, Beaty BJ 1985. Oral infection of *Aedes aegypti* with yellow fever virus: geographic variation and genetic considerations. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 34, 1219-1224.

Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipinski A, Kumar S 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.*, 30, 2725-2729.

Turusov V, Rakitsky V, Tomatis L 2002. Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT): ubiquity, persistence, and risks. *Environ. Health Perspect.*, 110, 125-128.

Valle D, Belinato T, Martins A 2015. Controle químico de *Aedes aegypti*, resistência a inseticidas e alternativas. In D Valle, *Dengue: Teorias e Práticas*, Fiocruz, Rio do Janeiro, p. 93-126.

Van den Berg H, Zaim M, Yadav RS, Soares A, Ameshewa B, Mnzava A, Hii J, Dash AP, Ejov M 2012. Global trends in the use of insecticides to control vector-borne diseases. *Environ. Health Perspect.*, 120, 577.

Vazeille M, Martin E, Mousson L, Failloux A 2011. Chikungunya, a new threat propagated by the cosmopolite *Aedes albopictus*. In *BMC Proc.*, BioMed Central Ltd, p. O8.

Vélez ID, Quiñones ML, Suárez M, Olano V, Murcia LM, Correa E, Arévalo C, Pérez L, Brochero H, Morales A 1998. Presencia de *Aedes albopictus* en Leticia, Amazonas, Colombia. *Biomédica*, 18, 192-198.

Vera-Maloof FZ, Saavedra-Rodriguez K, Elizondo-Quiroga AE, Lozano-Fuentes S, Black IV WC 2015. Coevolution of the Ile1, 016 and Cys1, 534 Mutations in the Voltage Gated Sodium Channel Gene of *Aedes aegypti* in Mexico. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 9, e0004263.

Villamil-Gómez W, González-Camargo O, Rodríguez-Ayubi J, Zapata-Serpa D, Rodríguez-Morales A 2016. Dengue, Chikungunya and Zika co-infection in a patient from Colombia. *Journal of Infection and Public Health*.

Villar L, Dayan GH, Arredondo-García JL, Rivera DM, Cunha R, Deseda C, Reynales H, Costa MS, Morales-Ramírez JO, Carrasquilla G 2015. Efficacy of a tetravalent dengue vaccine in children in Latin America. *N. Engl. J. Med.*, 372, 113-123.

Vontas J, Kioulos E, Pavlidi N, Morou E, della Torre A, Ranson H 2012. Insecticide resistance in the major dengue vectors *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 104, 126-131.

Wang J, Chuang K, Ahluwalia M, Patel S, Umblas N, Mirel D, Higuchi R, Germer S 2005. High-throughput SNP genotyping by single-tube PCR with Tm-shift primers. *Biotechniques*, 39, 885.

Ware G, Whitacre D 2004. *The Pesticide Book Meister Media Worldwide*. 6th ed., 6th ed., MeisterPro Information Resources, Ohio, 496 pp.

Weaver SC 2014. Arrival of Chikungunya virus in the new world: prospects for spread and impact on public health. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 8, e2921.

Weaver SC, Forrester NL 2015. Chikungunya: Evolutionary history and recent epidemic spread. *Antiviral Res.*, 120, 32-39.

Whitehorn J, Kien DTH, Nguyen NM, Nguyen HL, Kyrylos PP, Carrington LB, Tran CNB, Quyen NTH, Thi LV, Le Thi D 2015. Comparative Susceptibility of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* to Dengue Virus Infection After Feeding on Blood of Viremic Humans: Implications for Public Health. *J. Infect. Dis.*, jiv173.

WHO 2013. *Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases: Second WHO report on neglected tropical diseases*. World Health Organization, Geneva.

Chikungunya [homepage on the Internet], Las Americas: Organización Mundial de la Salud (OMS); 2016. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs327/es/>.

WHOPES-recommended compounds and formulations for control of mosquito larvae [homepage on the Internet]: WHOPES; 2013. WHO Pesticide Evaluation Scheme:

"WHOPES". Available from:
http://www.who.int/whopes/Mosquito_Larvicides_25_Oct_2013.pdf?ua=1.

WHO recommended insecticides for indoor residual spraying against malaria vectors [homepage on the Internet], Geneva: World Health Organization; 2014. WHO Pesticide Evaluation Scheme: "WHOPES". Available from:
http://www.who.int/whopes/Insecticides_IRS_17_Nov_2014.pdf?ua=1.

Wong P-S, Li M-z, Chong C-S, Ng L-C, Tan C-H 2013. *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse): A potential vector of Zika virus in Singapore. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 7, e2348.
 Wood O, Hanrahan S, Coetzee M, Koekemoer L, Brooke B 2010. Cuticle thickening associated with pyrethroid resistance in the major malaria vector *Anopheles funestus*. *Parasites & Vectors*, 3, 67.

Xu J, Bonizzoni M, Zhong D, Zhou G, Cai S, Li Y, Wang X, Lo E, Lee R, Sheen R 2016. Multi-country Survey Revealed Prevalent and Novel F1534S Mutation in Voltage-Gated Sodium Channel (VGSC) Gene in *Aedes albopictus*. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 10, e0004696.

Yakob L, Walker T 2016. Zika virus outbreak in the Americas: the need for novel mosquito control methods. *The Lancet Global Health*, In Press, Corrected Proof.

Yergolkar PN, Tandale BV, Arankalle VA, Sathe PS, Sudeep A, Gandhe SS, Gokhle MD, Jacob GP, Hundekar SL, Mishra AC 2006. Chikungunya outbreaks caused by African genotype, India. *Emerg. Infect. Dis.*, 12, 1580.

Zamora-Delgado J, Castaño JC, Hoyos-López R 2015. DNA barcode sequences used to identify *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Diptera: Culicidae) in La Tebaida (Quindío, Colombia). *Revista Colombiana de Entomología*, 41, 212.

Zanluca C, Melo V, Mosimann A, Santos G, Santos C, Luz K 2015. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 110, 569-572.